

Untersuchungen zur RNA-Bindung und Funktion der hnRNP-Proteine A1, A2 und C3

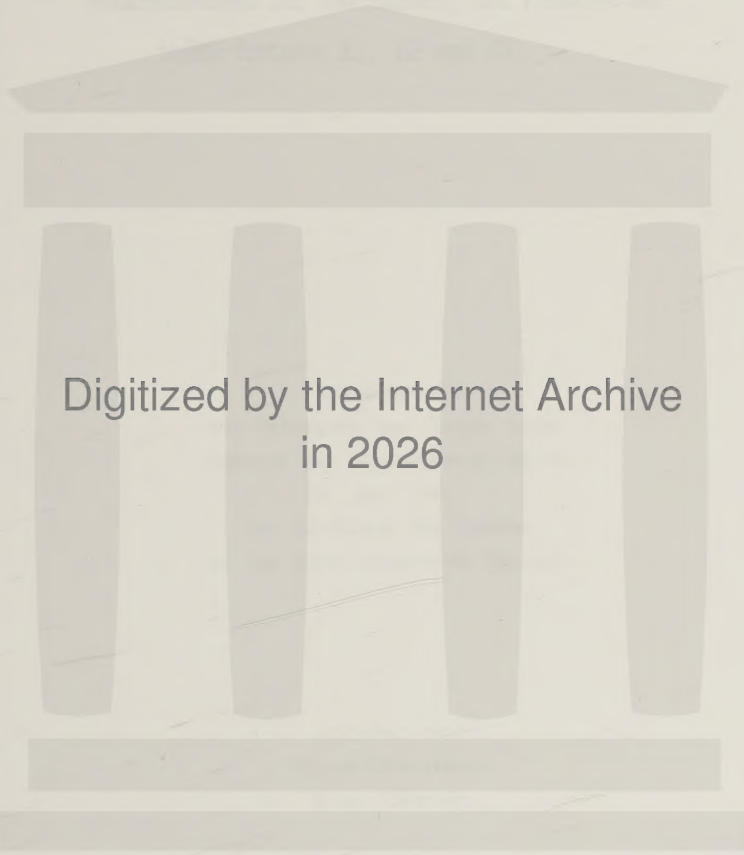
Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin

Birgit Henrich

Bochum, September 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546619_0008

Untersuchungen zur RNA-Bindung und Funktion der
hnRNP-Proteine A1, A2 und C3

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Birgit Henrich

Bochum, September 1988

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1988

1. Prüfer: Prof. Dr. K.P. Schäfer
2. Prüfer: Prof. Dr. O. Pongs
3. Prüfer: Prof. Dr. G.M. Schneider

Für Ernst und Marlene

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt Frau A. Kitzerow und Herrn Dr. A. Baumann für ihre Diskussions- und Kritikbereitschaft, Frau S. Geiger für ihre praktische Unterstützung, Herrn K. Grabert für seine fotografischen Arbeiten und Herrn Dr. H. H. Kiltz für die Erstellung der Hydropathiediagramme.

Ich danke Herrn Prof. Dr. O. Pongs für seine Unterstützung und Bereitschaft, für diese Arbeit als Korreferent tätig zu sein.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. K.P. Schäfer für die Überlassung des Themas und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Spleißen eukaryotischer RNA	1
1.2	Charakterisierung der hnRNP-Proteine	6
1.3	Ziel der Arbeit	8

2. Methoden

2.1	<u>Zellkultur</u>	9
2.1.1	HeLa-S3 Zellkultur	
2.1.2	Präparation und Kultur von Rinderlymphozyten	
2.2	<u>Präparation von Zellextrakten</u>	9
2.2.1	Isolierung von hnRNP-Komplexen aus HeLa-S3 Zellen	9
2.2.2	hnRNP-Präparation aus Rinderlymphozyten	10
2.2.3	Isolierung von Spleissextrakt aus HeLa-S3 Zellen	11
2.3	<u>Elektrophoretische Techniken</u>	12
2.3.1	Eindimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	
2.3.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	
2.3.3	Elektroelution von Proteinen	
2.3.4	Protein-Transfer aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose	
2.4	<u>Limitierte Proteolyse</u>	13
2.5	<u>In vitro Transkription</u>	14
2.5.1	β -Globin RNA-Synthese im Sp6-System	
2.5.2	Tetrahymena-RNA-Synthese im T7-System	
2.5.3	Aufreinigung der synthetisierten RNA	
2.5.4	Berechnung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten RNA	
2.6	<u>Detektion RNA-bindender Proteine/Peptide</u>	16

2.6.1	RNA-Bindung an membranfixierte Proteine	
2.6.2	RNA-Protein Komplexbildung in Lösung	
2.7	<u>Milde Nukleasebehandlung von RNA in Gegenwart von Proteinen</u>	17
2.8	<u>In vitro Spleissen von hnRNA</u>	18
2.8.1	Spleissen von β -Globin RNA	
2.8.2	Selbstspleissen von Tetrahymena rRNA	
2.9	<u>Nukleinsäure-Präparation aus HeLa-S3 Zellen</u>	19
2.9.1	Isolierung von poly A ⁺ RNA	
2.9.2	Isolierung genomischer DNA	
2.10	<u>Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren</u>	20
2.10.1	Agarosegele unter nichtdenaturierenden Bedingungen	
2.10.2	Formaldehydgele unter denaturierenden Bedingungen	
2.10.3	Harnstoff/Polyacrylamidgele unter denaturierenden Bedingungen	
2.11	<u>Elution von Nukleinsäuren aus Gelen</u>	21
2.11.1	DNA-Elution aus Agarosegelen	
2.11.2	RNA-Elution aus Polyacrylamidgelen	22
2.12	<u>Transfer elektrophorierter Nukleinsäuren auf Membranen</u>	23
2.12.1	Elektro-Transfer von RNA	
2.12.2	Diffusionstransfer von DNA	
2.13	<u>Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren</u>	23
2.13.1	5'-Endmarkierung von Oligodesoxyribonukleotiden	
2.13.2	Hexanukleotid-gestartete 2.Strangsynthese	
2.14	<u>Nukleinsäurehybridisierungen</u>	24
2.14.1	Hybridisierung mit cDNA	
2.14.2	Hybridisierung mit Oligodesoxyribonukleotiden	

2.15	<u>Isolierung sequenzspezifischer λ-Phagen aus einer cDNA-Bank</u>	26
2.15.1	Titerbestimmung eines λ -Phagenlysates	
2.15.2	Ausplattieren einer cDNA-Bank	
2.15.3	Plaque-Transfer auf Filter	27
2.15.4	In situ Hybridisierung transferierter Phagen-DNA	
2.15.5	Vereinzelung und Isolierung der sequenzspezifischen Phagen	
2.16	<u>Analytische und präparative Isolierung von Vektor-DNA</u>	28
2.16.1	Plasmid-Isolierung	
2.16.2	Präparation von Bakteriophagen-DNA	
2.17	<u>Restriktion von DNA</u>	30
2.18	<u>Klonierung in M13</u>	30
2.19	<u>Isolierung einzel- und doppelsträngiger M13 DNA</u>	31
2.20	<u>DNA-Sequenzierung nach Sanger</u>	32
2.21	<u>weitere Techniken</u>	33
2.21.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	
2.21.2	Fällung von Proteinen	
2.21.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	
2.21.4	Fällung von Nukleinsäuren	34
3.	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	<u>Proteinzusammensetzung der Kernextrakte</u>	35
3.2	<u>RNA-Bindungseigenschaften der hnRNP-Proteine</u>	36
3.2.1	RNA Bindungstests an zweidimensional aufgetrennte Coreproteine aus Rinderlymphozyten	37



3.2.2	RNA-Bindungsstudien an membranfixierte V8-Peptide der Coreproteine A1, A2 und C3 aus HeLa S3-Zellen	39
3.2.3	Protein/RNA-Komplexbildung in Lösung	41
3.3	<u>Milde Nukleasebehandlung A1-gebundender RNA</u>	44
3.4	<u>Spleissen von hnRNA in Gegenwart von Coreproteinen</u>	46
3.4.1	in vitro Spleissen von β -Globin hnRNA	46
3.4.2	Selbstspleissen von Tetrahymena-rRNA	48
3.5	<u>Isolierung und Charakterisierung einer A2-cDNA</u>	53
3.5.1	Identifizierung der A2-spezifischen mRNA	54
3.5.2	Isolierung und Charakterisierung A2-spezifischer λ -Phagen aus cDNA-Banken	56
3.5.3	Sequenzierung der A2-positiven Bakteriophagen	60
3.6	<u>Nachweis A2-spezifischer DNA-Sequenzen in genomischer HeLa-DNA</u>	65
3.7	<u>Vergleich der basischen Coreproteine A1 und A2</u>	67
3.7.1	cDNA- und Protein-Sequenzvergleich	67
3.7.2	Hydropathieprofile der A1- und A2-Proteine	71
3.7.3	Analyse der RNA-Bindungsstelle beider Proteine	73
4.	<u>Diskussion</u>	76
4.1	Charakterisierung der RNP-Proteine	76
4.2	Differenzierte RNA-Bindungsfähigkeit der hnRNP-Proteine	78
4.3	Einfluß von Protein/Protein-Interaktionen auf die RNA-Bindungsfähigkeit des Proteins A1	81
4.4	Funktionen der hnRNP-Proteine	82
4.5	Gene der hnRNP-Proteine	83
4.6	Zusammenfassung	84
5.	<u>Literaturverzeichnis</u>	86
6.	<u>Lebenslauf</u>	93

II. Abkürzungen

A	Adenosin
AA/AS	Aminosäuren
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Basen
BSA	Rinderserumalbumin
c _{end}	Endkonzentration
C	Cytosin
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DE-	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)- N,N,N'.N'-Tetraessigsäure
g	Gravitationsbeschleunigung im Erdfeld
G	Guanosin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton (Einheit des relativen Molekulargewichts)
M _r	relative Molekülmasse
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MN	Micrococcusnuklease
MOPS	3-Morpholino-propansulfansäure
mRNA	"messenger" RNA

N	Nukleotide
NCS	Serum aus neugeborenen Kälbern
NCS ⁺	hitzeinaktivierte Serum aus neugeborenen Kälbern
NEPHGE	Nichtgleichgewichts-pH-Gelelektrophorese
NP 40	Nonidet P 40 (nichtionisches Detergenz)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
pAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
pI _{app.}	scheinbarer isoelektrischer Punkt unter NEPHGE-Bedingungen
pfu	plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationseinheit nach Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T _M	Schmelzpunkt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
u	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜT	über Tag
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D Galaktopyranosid

III. Materialien

1. Chemikalien

Acrylamid	Fluka
Agarose	Sigma
Ampholine	LKB
Antibiotika	BRL, Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	BRL
Concanavalin A	Boehringer
DEAE-Cellulose (DE 52)	Whatman
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
Harnstoff ("enzyme grade")	BRL
Hexadesoxyribonukleotide	Pharmacia
Isopropyl- β -Thiogalaktosid	BRL
Lysozym	Sigma
N',N'-Methylenbisacrylamid	Sigma
NP 40 (Nonidet P 40)	Sigma
Nukleotide	Boehringer, PL Biochemicals
Oligo(dT)-Cellulose	PL Biochemicals
Ovalbumin	Sigma
Polyethylenglycol C 600	Fluka
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Tween 80	Serva
X-Gal	BRL

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Baker, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

2. radioaktive Substanzen

$\alpha(^{32}\text{P})$ -rUTP (760 Ci/mmol)	Amersham Buchler
$\alpha(^{32}\text{P})$ -dATP (800 Ci/mmol)	New England Nuclear (NEN)
$\gamma(^{32}\text{P})$ -dATP (6000 Ci/mmol)	NEN
$\alpha(^{35}\text{S})$ -dATP (600 Ci/mmol)	Amersham Buchler

3. Membranen

Nitrozellulose	Schleicher & Schüll
Nylonmembranen (Hybond N)	Amersham Buchler

4. Enzyme

DNase (RNase frei)	Boehringer
Klenow-Enzym	Boehringer
Micrococcussuklease (E.C.3.1.4.7)	Boehringer
Proteinase K (E.C.3.4.21.14)	Merck
RNase A, RNase T1	Boehringer
RNasin	Promega Biotec
SP6-Polymerase	Amersham
Staphylococcus Aureus V8 Protease	Miles
T4-DNA-Ligase	Boehringer
T4-Polynukleotidkinase	Pharmacia
T7-Polymerase	Pharmacia

Alle Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer, Pharmacia oder BRL bezogen.

5. Puffer und Stammlösungen

Denhardt's (200 x)	4 % (w/v) Ficoll 400
	4 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
	4 % (w/v) BSA

NET (20 x)	3 M NaCl
	300 mM Tris/HCl pH 7,9
	20 mM Na-EDTA

PBS	150 mM NaCl
	10 mM Na_2HPO_4
	2 mM KH_2PO_4

gesättigtes Phenol	Phenol wurde bei 65°C aufgeschmolzen, (teilweise destilliert), mit 0,1% (w/v) Hydroxychinolin versetzt und mehrmals mit 1 M Tris/HCl, pH 8.0 bzw. 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 extrahiert.
--------------------	--

SET (20 x)	3 M NaCl
	400 mM Tris/HCl, pH 7,9
	20 mM Na-EDTA

SM		100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 10 mM CaCl_2 10 mM MgCl_2
SSC (20 x)		0,3 M Na-Citrat, pH 6,8 3,0 M NaCl
TAE (10 x)		400 mM Tris-Base 400 mM Essigsäure 20 mM Na-EDTA
TBE (10 x)		890 mM Tris-Base 890 mM Borsäure 20 mM Na-EDTA
TE		10 mM Tris/HCl, pH 7,4 1 mM Na-EDTA
LB/Mg-Medium	pro Liter:	10 g Bacto Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 2 g MgSO_4 pH 7,4 (7 g Agar für Platten)

6. Zellkultur

MEM _{spez}	pro Liter:	11,3 g MEM-Trockenpulver 2,0 g NaHCO_3 0,45 g Glucose 0,48 g HEPES, pH 7,4
RPMI-Medium	pro Liter:	10,4 g RPMI 1640 2,0 g NaHCO_3 4,0 μl β -Mercaptoethanol 2,4 g HEPES, pH 7,4

Die Medien wurden mit je 6000 u/ml Penicillin (4 g/l) und Streptomycinsulfat (8 g/l) versetzt.

1. Einleitung

Die Expression der genetischen Information von der DNA über RNA-Intermediate zum Protein ist in eukaryotischen Zellen sehr komplex reguliert. Eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer funktionellen mRNA kommt co- und post-transkriptionalen Prozessierungen zu, die an dem primären Transkript (hnRNA) durchgeführt werden.

Mehrere Modifizierungsreaktionen dienen dem Schutz der reifenden RNA:

Die Degradation der RNA durch Exonukleasen wird durch die Übertragung eines 7-Methylguanosinrestes (Kappe) auf das 5'-Ende der naszierenden hnRNA verhindert (Nevins, 1983; Shatkins, 1976). Diese 5'-Modifizierung der mRNA ist nach dem Transport ins Cytoplasma an der Bildung des Initiationskomplexes zur Translation beteiligt (Rhoads, 1983).

Methylierungen an Adenylresten (N^6) schützen die RNA vor endonukleolytischem Abbau.

Die Polyadenylierung der RNA erfüllt unter anderem die Funktionen der Stabilisierung und Stimulierung des mRNA-Transports ins Cytoplasma (Nudel et al., 1976; Müller et al., 1983).

Die Aufklärung des Spleißmechanismus im Rahmen der Prozessierungsreaktionen eukaryotischer hnRNA war in den letzten Jahren das Ziel intensiver Studien.

1.1 Spleißen eukaryotischer hnRNA

In höheren Eukaryoten enthalten die meisten Protein-kodierenden Gene intervenierende, nichtkodierende Sequenzen (Introns). Das exakte Entfernen dieser Sequenzen während des RNA-Spleißens ist ein Beispiel für die hohe Spezifität, mit der biosynthetische Prozesse ablaufen.

Selbstspleißende RNA-Vorläufer (z.B. Tetrahymena rRNA) erreichen diese Spezifität primär durch intramolekulare Interaktion (Cech & Bass, 1986), während die Transkripte der RNA-Polymerase II zum

Spleißen die Interaktion zellulärer Faktoren und spezifischer Erkennungssequenzen auf der hnRNA benötigen.

Die Entwicklung eines in vitro Spleißsystems ermöglichte es, die Sequenzanforderungen an eine zu spleißende hnRNA zu bestimmen, und die notwendigen Faktoren zu charakterisieren (Padgett et al., 1983/1986; Green, 1986; Maniatis et al., 1987). Bevorzugt werden hnRNAs gespleißt, die eine 5'-Kappe besitzen (Babich, 1980). Die Spleißreaktion verläuft nach einem 2 Stufen-Mechanismus (Kraimer et al., 1984). Der erste Schritt beinhaltet die Spaltung der hnRNA an der 5'-Spleißstelle und die Bildung einer 2'-5' Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-terminalen G-Rest des Introns und dem Adenosin des Verzweigungspunktes. Im zweiten Schritt findet die Spaltung an der 3'-Spleißstelle statt; die Ligation der Exons führt zum Freisetzen des Introns als Lassostruktur (siehe schematische Darstellung).

Elektronenmikroskopische Chromatin-Aufnahmen zeigten, daß die naszierende RNA mit RNP-Partikeln besetzt und noch während ihrer Synthese gespleißt wird (Beyer & Osheim, 1988).

Nach der Synthese der 3'-Spleißstelle, die einen pyrimidinreichen Abschnitt umfaßt und mit den Nukleotiden AG endet, bildet sich an den Pyrimidinen eine partikuläre Struktur aus. In vitro Untersuchungen zeigten, daß das hnRNP-Protein C3 und ein nicht näher charakterisiertes 62 kd-Protein an diesem Komplex beteiligt sind (Mariano et al., 1988). Schon im Jahre 1986 konnten Choi et al. mit Antikörpern gegen das RNP-Protein C3 zeigen, daß sein Entfernen aus dem Partikel zur Inhibierung der Spleißreaktion führt. Neuere Untersuchungen weisen auf das Vorhandensein der Core-Proteine A1 und D in diesem Partikel hin (Swanson & Dreyfuss, 1988). U5 snRNP konnte mit dem 3'-spleißstellengebundenen Partikel immunpräzipitiert werden (Chabot et al., 1985), seine spezifische Bindung an die hnRNA ist durch Protein/RNA-Interaktionen zu erklären, da die U5 snRNA keine signifikante Komplementarität zur 3'-Spleißstelle aufweist (Maniatis & Reed, 1987).

Da der Komplex an der 3'-Spleißstelle mit einem Durchmesser von 25 nm ca. 100 Nukleotide der RNA abdeckt, konnte die Position

des Partikels in vivo nicht eindeutig festgelegt werden (Pyrimidin-stretch, Intron-Exon Übergang oder Verzweigungspunkt).

In Folge der Partikelbildung an der 3'-Spleißstelle bildet sich an der 5'-Spleißstelle (Intronbeginn mit GU) ein Komplex aus, der U1 snRNP enthält. Sequenzanalysen zeigten, daß das 5'-Ende der U1 snRNA komplementär zur 5'-Spleißstelle ist (Lerner et al., 1980; Mount & Steitz, 1981). RNase H-Experimente bestätigten die Bindung des U1 snRNPs über Basenpaarung an die 5'-Spleißstelle (Ruskin & Green, 1985). Diese snRNP-Bindung wird durch einen im 5'-Komplex enthaltenen Faktor verstärkt, der bisher nicht näher charakterisiert werden konnte.

Die bisher beschriebene Komplexbildung an den Rändern der Introns ist energieunabhängig (kein ATP-Bedarf).

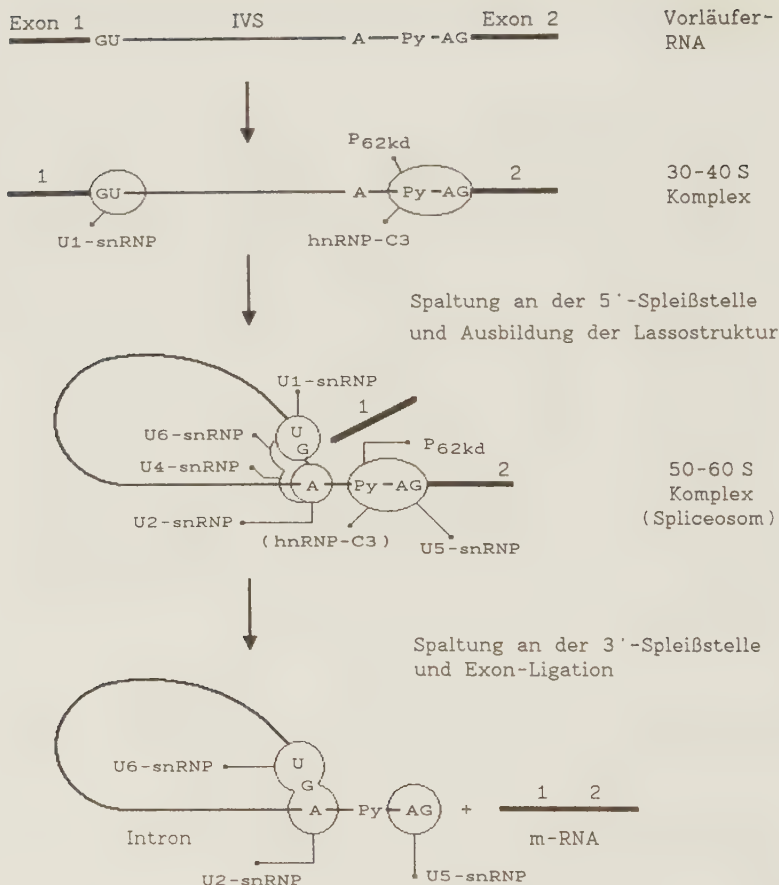
In einem energieabhängigen Schritt (in Gegenwart von ATP) bindet U2 snRNP an die Verzweigungsstelle des Introns unter Bildung eines 50-60 S sedimentierenden Komplexes ("Spliceosom"). Verschiedene hnRNAs zeigten eine Konsensussequenz der Verzweigungsstelle:



Sie befindet sich 18-40 Nukleotide 'upstream' der 3'-Spleißstelle. Der Verzweigungspunkt ist immer ein Adenosin.

Da die U2 snRNA eine stärkere Komplementarität zur U1 snRNA als zur hnRNA aufweist, führt dies möglicherweise dazu, daß nach der U2 snRNP-Bindung an den Verzweigungspunkt die hnRNA an der 5'-Spleißstelle gespalten wird, und das 5'-terminale Guanosin durch die Affinität der snRNAs U1 und U2 zum Verzweigungspunkt gebracht wird. Es bildet sich durch eine 2'-5' Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-terminalen Guanosin des Introns und dem Adenosin des Verzweigungspunktes eine Lassostruktur aus, die mit den gebundenen Faktoren bei 50-60 S sedimentiert.

Die snRNPs U4, U5 und U6 sind zum Spleißen der hnRNA ebenfalls essentiell, doch sind ihre genauen Positionen und Funktionen im Spliceosom noch nicht bekannt (Berget & Robberson, 1986; Black & Seitz, 1986).



Schematische Darstellung des zweistufigen Spleißmechanismus

Die snRNPs stellen eine Gerüststruktur dar, die die entsprechenden Bereiche der hnRNA in direkte Nachbarschaft zueinander bringt, an denen das Spleißen stattfindet.

Anschließend erfolgt die Spaltung an der 3'-Spleißstelle und die Exon-Ligation. Das intakte Intron wird aus dem Komplex als Lasso-

struktur entfernt, das die snRNPs U2, U5 und U6 weiterhin gebunden hat (Konarska et al., 1987). Der Ablauf dieser Reaktionen ist ebenfalls energieabhängig (Sawa et al, 1988).

Der Mechanismus, nach dem ein einzelnes Intron aus einer hnRNA entfernt wird, konnte durch in vitro Spleißexperimente größtenteils geklärt werden. Da die meisten hnRNAs jedoch mehrere intervenierende Sequenzen enthalten, ergibt sich nun die interessante Fragestellung, in welcher Reihenfolge die RNAs gespleißt werden, und welche Faktoren diesen Vorgang beeinflussen und kontrollieren.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen naszierender RNA zeigten, daß einige Introns eines RNA-Vorläufers sofort nach ihrer Synthese entfernt werden ("first-come-first-served"-Prinzip; Aebi et al., 1986). Alternatives Spleißen, wobei eine Lassostruktur zwischen dem 5'-terminalen Guanosin eines Introns mit dem Adenosin der Verzweigungsstelle des gerade synthetisierten "downstream"-Introns ausgebildet und gespleißt wurde, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Lang & Spritz, 1987).

Das cotranskriptionale Spleißen wird durch Befunde unterstützt, daß die Polyadenylierung für den Spleißvorgang nicht notwendig ist (Zeevi et al., 1981; Green et al., 1983), und daß das Spleißen der Polyadenylierung sogar vorangehen kann (Mariman et al., 1983). Die derzeitigen Erkenntnisse widerlegen jedoch nicht, daß neben cotranskriptionalem Spleißen auch posttranskriptionales Entfernen von Introns stattfindet. (Für alternatives- und trans-Spleißen bliebe ein größerer Freiraum, wenn die Spleißstellen-Auswahl nach der Polyadenylierung stattfindet.)

Bina et al. beschrieben 1980 die Signalwirkung der Polyadenylierung auf den Spleißprozeß. Neuere Untersuchungen zeigten, daß sich "stromabwärts" des Polyadenylierungssignals AAUAAA eine U-reiche Region befindet. Die Bindung der C-Proteine (aus den RNP-Partikeln) sowohl an den Pyrimidinstretch der 3'-Spleißstellen von Introns, als auch an den pyrimidin-reichen Bereich, der sich an das Polyadenylierungssignal anschließt, lassen eine Verknüpfung des Spleißvorgangs und der Polyadenylierung von hnRNAs/mRNAs vermuten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen gaben die ersten Hinweise darauf, daß nichtribosomale, nukleäre RNA in Ribonukleoprotein-Komplexen (hnRNPs) vorkommt (Gall, 1955/1956). Die hnRNP-Partikel zeigen in situ eine wohlgeordnete Struktur auf wachsenden hnRNAs (Beyer et al., 1980/1981; Osheim, 1985; Tsanev & Djondjurov, 1982). Wie bei einer Perlenschnur sind die globulären RNP-Partikel - durch RNase-sensitive Bereiche voneinander getrennt - auf der RNA angeordnet (Foe et al., 1976).

Es wurden verschiedene Techniken zur Präparation von RNP-Partikeln entwickelt. Je nach Versuchsvorschrift sedimentieren die isolierten Protein/RNA-Komplexe in Sukrosegradienten bei 30-250 S. Milde Nukleasebehandlung überführt die heterodispersen Strukturen in 30-40 S sedimentierende Monopartikel (Pederson, 1974; Karn et al., 1977).

Samarina et al. veröffentlichten 1968 eine Vorschrift zur Isolierung von RNP-Monopartikeln, die aus den Zellkernen durch Aktivierung einer endogenen Nuklease (bei pH 8,0) freigesetzt werden.

Die Proteinanalyse der 30-40 S sedimentierenden Komplexe führte zur Identifizierung der Core-Proteine, die bis zu 90% des Proteinanteils im Monopartikel repräsentieren (Beyer et al., 1977).

Bei der Auftrennung der Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen, überwiegen 3 Doublets, die den Core-Proteinen zugeordnet werden: A1 (34 kd), A2 (36 kd), B1 (37 kd), B2 (38 kd), C1 (41 kd) und C2 (43 kd). Werden die Proteine auf einem zweiten Gel ihren Ladungen entsprechend getrennt, ergibt sich ein komplexeres Muster (siehe Ergebnisteil, Abb.1). Das Protein A1 spaltet sich in A1 und A1x; B1 in B1a, B1b und B1c; C1 in C1 und C3; C2 in C2 und C3x auf.

Die basischen Core-Proteine (A, B, C1 und C2) zeichnen sich durch einen hohen Glycinanteil aus (ca.20%) und sind durch die modifizierte Aminosäure N⁶,N⁶-Dimethylarginin charakterisiert (Wilk

et al., 1984). Sie existieren in Form von Ladungsisomeren, deren Vorkommen z.B. in Rinderlymphozyten sehr ausgeprägt ist. Die Ladungsisomere werden größtenteils durch Phosphorylierungen hervorgerufen, was einen Einfluß auf ihre regulatorischen Funktionen vermuten läßt (Suria & Liew, 1979; Peters & Comings, 1980, Wilk et al., 1983/ 1985).

In vitro Rekonstitutionen zeigten, daß die RNP-Proteine mit jeder Ribonukleinsäure 30-40 S sedimentierende Komplexe ausbilden können (Wilk, 1984). Wesentlich effizienter rekonstituieren RNP-Partikel mit eukaryotischen RNA-Vorläufern (Henrich, 1985), was erste Hinweise lieferte, daß sich RNP-Partikel nicht völlig sequenzunspezifisch auf der hnRNA ausbilden.

Wie in Kap.1.1 beschrieben, sind die C-Proteine der RNP-Komplexe an der Prozessierung einer hnRNA beteiligt. Auch das Vorkommen des Proteins A1 in Abhängigkeit von der Zellaktivität weist auf die Teilnahme der RNP-Proteine an der Regulation der Genexpression hin. In ruhenden Zellen enthalten die RNP-Partikel nur minimale Mengen des Coreproteins A1. Mit zunehmender Zellproliferation steigt die Konzentration des Proteins A1 im RNP-Komplex (Henrich et al., 1985).

Valentini et al. veröffentlichten 1985, daß Antikörper gegen Einzelstrang-DNA-bindende Proteine (ssDBPs) mit den Core-Proteinen der RNP-Partikel aus HeLa Zellen und Kalbsthymus kreuzreagieren. Sequenzdaten weisen auf eine Vorläufer/Produkt-Beziehung zwischen dem RNP-Protein A1 und dem ssDBP UP I hin. In vitro läßt sich das Core-Protein A1 durch proteolytischen Abbau in das UP I überführen. Die proteolytische Spaltung, die das UP I-Fragment liefert, erfolgt zwischen zwei strukturell verschiedenen Domänen: die α -helicale UP I Domäne und die glycinreiche, 'random coil' C-terminale Domäne. Beide Domänen könnten für die unterschiedliche Protein/Protein- bzw. Protein/Nukleinsäure-Interaktion verantwortlich sein. Das ssDBP UP IB zeigt Ähnlichkeiten mit dem Core-Protein A2, auch hier wird eine Vorläufer/Produktbeziehung angenommen (Pandolfo et al., 1985).

Einzelstrang-DNA-bindende Proteine erniedrigen den Schmelzpunkt einer doppelsträngigen DNA, binden an einzelsträngige Nukleinsäuren und können in vitro die DNA-Polymerase α stimulieren (Riva et al., 1986). Es ist denkbar, daß die RNP-Proteine einerseits auf der Ebene der RNA-Prozessierung, und andererseits ihre proteolytischen Spaltprodukte (die ssDBPs) auf der Ebene der DNA-Replikation die Regulation der Genexpression beeinflussen.

1.3 Ziel der Arbeit

Die zur Verfügung stehenden Daten zeigen, daß die RNP-Proteine nicht nur zur Kondensation und zum Schutz der hnRNA dienen. Die nachgewiesene Fähigkeit der RNP-Proteine, an hnRNA zu binden, führt zu der Fragestellung, welcher Art die Protein/RNA-Bindung ist, und ob die Wechselwirkung der RNP-Proteine untereinander die RNA-Bindung beeinflußt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die RNA-Bindung einzelner RNP-Proteine näher charakterisiert, die Funktion der gebundenen Proteine in Nuklease- und in vitro Spleiß- Experimenten untersucht werden.

Die Bestätigung der beschriebenen Eigenschaften der Core-Proteine A1 und C3 ist nicht zuletzt der Sequenzanalysen der Proteine zu verdanken (A1: Buvoli et al., 1988; Swanson et al., 1987). Daher ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die cDNA-Sequenz des Core-Proteins A2 zu bestimmen, und mit Hilfe der abgeleiteten Proteinsequenzen die lokalisierten Bindungsdomänen der Proteine A1, A2 und C3 zu analysieren.

2. Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 HeLa-S3 Zellkultur (Puck et al., 1956)

HeLa-S3 Zellen wurden in MEM_{spez.}-Medium (Joklik's Modifikation) mit 5% Serum aus neugeborenen Kälbern (NCS) als Rührkultur gehalten. Die Zellen wurden durch tägliches 1:1 Verdünnen mit Serum versetztem Medium in logarithmischem Wachstum gehalten (Zelldichte: $3 - 8 \times 10^5$ Zellen/ml).

2.1.2 Präparation und Kultur von Rinderlymphozyten (Peters, 1975)

Nach einer Vorschrift von Peters (1975) wurde aus retropharyngealen Rinderlymphknoten eine Lymphozyten-Zellkultur präpariert.

Erythrozyten, die bei dem Gewebeaufschluß mitisoliert wurden, wurden durch Lyse mit Wasser und anschließender Filtration entfernt. Die Lymphozyten wurden zentrifugiert ($480 \times g$, 10 min, $4^\circ C$) und in RPMI-Medium mit 10% NCS⁺ resuspendiert (Zelldichte: 5×10^6 Zellen/ml).

Zur hnRNP-Präparation aus ruhenden Lymphozyten wurden die Zellen sofort aufgearbeitet (Kap.2.2.2).

Die mitogene Stimulation der Rinderlymphozyten erfolgte durch Zugabe von Concanavalin A (ConA; $10 \mu g/ml$). Die Zellsuspension wurde auf Fernbachkolben verteilt (400 - 500 ml/Kolben) und bei $37^\circ C/7,5\% CO_2$ im Brutschrank inkubiert. Nach 40 h wurden die stimulierten Lymphozyten aufgearbeitet (Kap.2.2.2).

2.2 Präparation von Zellextrakten

2.2.1 Isolierung von hnRNP-Komplexen aus HeLa-S3 Zellen (Samarina et al., 1968)

PBS	150 mM NaCl	
	10 mM Na ₂ HPO ₄	
	2 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4

Lysis-Puffer	10	mM NaCl	
	1.5	mM MgCl ₂	
	10	mM Tris/HCl	pH 7,0
STM-A	100	mM NaCl	
	1.5	mM MgCl ₂	
	10	mM Tris/HCl	pH 7,0
STM-B	100	mM NaCl	
	1.5	mM MgCl ₂	
	10	mM Tris/HCl	pH 8,0

Alle Aufarbeitungsschritte wurden auf Eis durchgeführt, falls nicht explizit erläutert.

Die HeLa-S3 Zellen wurden abzentrifugiert (450 x g, 15 min, RT) und zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach Resuspendieren der Zellen in Lysis-Puffer (3 x 10⁷ Zellen/ml) wurde die Lösung auf 0,5% (v/v) NP-40 gebracht und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch 8-10 Stöße eines eng sitzenden Glaspistills in einem "Dounce"-Homogenisator aufgebrochen. Die Kerne wurden pelletiert (600 x g, 6 min, 0°C) und je einmal mit Lysis-, STM-A und STM-B Puffer gewaschen. Nach Resuspendieren der Kerne in STM-B Puffer (3 - 5 x 10⁸ Kerne/ml) wurden sie 3 x 30 min bei RT unter langsamem Rühren extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden nach Zentrifugation (16.300 x g, 15 min, 0°C) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Sollten aus dem Kernextrakt 40S-Partikeln aufgereinigt werden, wurden die vereinigten Überstände einer Zonenzentrifugation unterworfen. Je 1 ml nukleärer Extrakt (0,5 - 1 mg Protein) wurde auf einem 15 - 30% (w/v)-Sucrosegradienten in STM-A im SW40 Rotor aufgetrennt (88.000 x g, 16 h, 2°C). Während des Fraktionierens des Gradienten (0,8 ml Fraktionen) wurde mit einem Gilford-Spektralphotometer die Absorption bei 260 nm gemessen. Die 40S-Partikel enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und bei -70°C gelagert.

2.2.2 hnRNP-Präparation aus Rinderlymphozyten (Wilk et al., 1985)

Lysis-Puffer	10	mM NaCl	
	3	mM CaCl ₂	
	1.5	mM MgCl ₂	
	10	mM Tris/HCl	pH 7,0

"Magic"-Puffer
 1 Teil 10%ige Na-Desoxycholatlösung (w/v)
 2 Teile 10%ige Tween 80 Lösung (v/v)

Die Isolierung von hnRNP-Partikeln aus Rinderlymphozyten erfolgte analog der HeLa Zellen-Aufarbeitung (Kap.2.2.1).

Folgende Änderungen waren zum Zellaufschluß von Lymphozyten notwendig:

Die Lyse der Zellen erfolgte in einem CaCl_2 -haltigen Lysispuffer. Das den Kernen anhaftende Cytoplasma wurde entfernt, indem dem Ly-sat 1% (v/v) "Magic"-Lösung zugesetzt wurde, und die anschließende Homogenisierung zuerst mit 4 Stößen eines lose sitzenden Pistills durchgeführt wurde.

2.2.3 Isolierung von SpleiBextrakt aus HeLa-S3 Zellen (Dignam, Lebovitz & Roeder, 1983)

Puffer A	10	mM K-HEPES	pH 7,9
	1.5	mM MgCl_2	
	10	mM KCl	
	0.5	mM DTT	
Puffer B	300	mM K-HEPES	pH 7,9
	1400	mM KCl	
	30	mM MgCl_2	
Puffer C	20	mM Na-HEPES	pH 7,9
	25	% Glycerin (v/v)	
	420	mM NaCl	
	1.5	mM MgCl_2	
	0.2	mM Na-EDTA	
	0.5	mM PMSF	
	0.5	mM DTT	
Puffer D	20	mM K-HEPES	pH 7,9
	20	% Glycerin (v/v)	
	100	mM KCl	
	0.2	mM EDTA	
	0.5	mM PMSF	
	0.5	mM DTT	

Die Präparation des SpleiBextrakts aus HeLa-S3 Zellen erfolgte nach der Vorschrift von Dignam et al. (1983).

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer wurden sie im fünffachen Pelletvolumen in Puffer A resuspendiert. Nach Zentrifugation und Aufnahme der Zellen im zweifachen Pelletvolumen in Puffer A wurden die Zellen durch 10 Stöße eines eng sitzenden Pistills im "Dounce"-Homogenisator lysiert. Die Kerne wurden abzentrifugiert ($25.000 \times g$, 2 min, 4°C), in 3 ml Puffer C/ 10^9 Zellen im Homogenisator resuspendiert und 30 min bei 4°C langsam extrahiert.

Nach Zentrifugation ($25.000 \times g$, 30 min, 4°C) wurde der Überstand in der Kälte 5 h gegen das 50fache Volumen Puffer D dialysiert.

Der zentrifugierte Überstand (Spleißextrakt) wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3 Elektrophoretische Techniken

2.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese von Proteinen (Laemmli, 1970)

Proteine und Peptide wurden nach der Methode von Laemmli (1970) auf SDS/Polyacrylamidgelen analysiert. Die Gele enthielten 0,1% NaDodSO_4 (SDS) und je nach Molekulargewicht der zu trennenden Peptide einen Anteil von 8-18% (w/v) Acrylamid.

2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (O'Farrell et al., 1977)

Die zu analysierenden Proteine wurden in der ersten Dimension unter NEPHGE-Bedingungen gemäß ihrer Ladung (pI_{app}) getrennt (1600 Vh) (O'Farrell et al., 1977). In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Kap.2.3.1).

2.3.3 Elektroelution von Proteinen (nach Biometra)

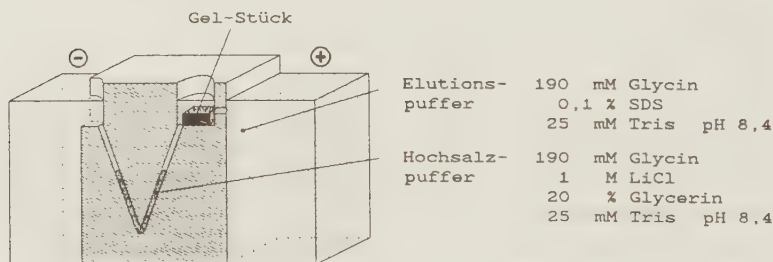


Abb.2.3.3: Längsschnitt durch einen Elutionskanal

Nach der Gelelektrophorese wurden die gewünschten Proteine schmalbandig aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen. Die Gelstücke wurden 2 x 10 min in Elutionspuffer equilibriert und zerkleinert in die Probentröge der Elektroelutionsapparatur gegeben (siehe Abb.2.3.3).

Die Proteine wurden elektrophoretisch aus der Gelmatrix eluiert (angelegte Spannung: 200V).

An der Grenzschicht zur Hochsalzlösung reicherten sich die Proteine an, da sie zum Ladungstransport nur noch minimal beitrugen.

Nach einer Elutionsdauer von 30 - 60 min wurde dem Elutionskanal die proteinhaltige Hochsalzlösung entnommen. Nach Dialyse gegen einen Niedrigsalzpuffer (z.B. STM-B) wurden die Proteinlösungen bei -20°C gelagert.

2.3.4 Protein-Transfer aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose

A. Elektrophoretischer Proteintransfer (Towbin et al., 1979)

Die gelelektrophoretisch getrennten Proteine wurden nach der Versuchsvorschrift von Towbin et al. (1979) auf Nitrozellulose transferiert. Bei dieser Methode wurde nur eine Kopie der Proteinverteilung im Gel erhalten.

B. Diffusionstransfer von Proteinen (Bowen et al., 1980)

Die Versuchsdurchführung entsprach der bei Bowen et. al. (1980) beschriebenen.

Der Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose erfolgte durch Diffusion bei RT. Durch Verwendung einer "Sandwich"-Apparatur wurden zwei Kopien der Proteinverteilung eines Gels erhalten.

Zur besseren Renaturierung der Proteine auf der Nitrozellulose enthielt der Transferpuffer 4M Harnstoff.

2.4 Limitierte Proteolyse (Cleveland et al., 1977)

V8 Puffer	60	mM Tris/HCl	pH 6,8
	1	mM Na-EDTA	
	0,1	% SDS (w/v)	
	5	% β -Mercaptoethanol (v/v)	
	10	% Glycerin (v/v)	

In Anlehnung an die Vorschrift von Cleveland et al. (1977) wurden Proteine mit V8 Protease partiell verdaut.

Die mit Coomassie Blau gefärbten Proteinbanden wurden aus SDS/Polyacrylamidgelen ausgestochen und 60 min in V8 Puffer equilibriert. Nach dem Einfügen der Gelstücke in die Taschen eines 18% SDS/Polyacrylamidgels wurde die entsprechende Menge V8 Protease auf die Gelstücke pipettiert (siehe Kap.3; Ergebnisteil). Anschließend wurden die Proben elektrophoriert, bis sich die Bromphenol Blau-Front 1 cm über dem Trenngel fokussiert hatte.

Zur limitierten Proteolyse durch die V8 Protease wurde der Stromfluß 30 - 45 min unterbrochen. Die entstandenen Peptide wurden bei einer Stromstärke von 40 mA elektrophoriert.

Alternativ zur Verwendung von Proteingelstücken konnten zur limitierten Proteolyse elektroeluierte Proteine eingesetzt werden. Die mit V8 Puffer versetzten Proteineluate (Kap.2.3.3) wurden, wie die V8 Protease, in die Taschen des Gels pipettiert. Die weitere Versuchsdurchführung entsprach der oben beschriebenen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entweder Coomassie Blau gefärbt oder zur Protein-Analyse auf Nitrozellulose transferiert (Kap.2.3.4).

2.5 In vitro Transkription

2.5.1 β -Globin hnRNA-Synthese im SP6-System (Butler et al., 1982; Melton et al., 1984)

Die Kaninchen β -Globin enthaltenden SP6-Vektoren wurden durch entsprechende Restriktion linearisiert (siehe Ergebnisteil) und nach der Methode von Butler und Chamberlin (1982) transkribiert.

Sollte die hnRNA im weiteren Versuch gespleißt werden (Kap.2.8.1), wurde dem Transkriptionsansatz das Kappen-Analogon m⁷G(5')ppp(5')G im Überschuß zugesetzt (Konarska et al., 1984).

Unter diesen Bedingungen wurden hnRNAs synthetisiert, die mit einer Kappe versehen waren und sich aus diesem Grund besser in vitro spleißen ließ.

2.5.2 Tetrahymena RNA-Synthese im T7-System

Ein Tha I Fragment der Tetrahymena rDNA wurde mit Hind III-Linkern versehen in das Plasmid pT7-2 einkloniert. Das Tha I-Fragment enthält

die intervenierende Sequenz und einen Teil der flankierenden Exons (siehe Ergebnisse). Dieser Transkriptionsvektor (pTT1A3-T7) wurde von A.Zaug, University of Colorado at Boulder zur Verfügung gestellt. Ein typischer Transkriptionsansatz zur Isolierung von Vorläufer-RNA enthielt:

40	mM	Tris/HCl	pH 7,5
12	mM	MgCl ₂	
10	mM	DTT	
4	mM	Spermidin	
je 1	mM	ATP, GTP, CTP und UTP	
1mCi/ml		α -(³² P) UTP	
20	µg/ml	pTT1A3-T7 - Eco RI restringiert	
100	u/ml	T7 Polymerase	

Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurde die Transkription durch Zugabe von EDTA ($c_{\text{end}} = 15 \text{ mM}$) gestoppt. Die Tetrahymena Vorläufer-RNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgereinigt (Kap. 2.11.2).

2.5.3 Aufreinigung der synthetisierten RNA

Je nach Transkriptionsbedingung hatten nicht alle Transkripte volle Länge. Störte dies für die weitere Verwendung der RNA nicht, wurden die nichteingebauten Nukleotide über eine Gelfiltration entfernt. Eine 1ml Pipettenspitze wurde mit Glaswolle abgedichtet und mit Bio-gel P60-Säulenmaterial gefüllt. Die Säule wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen TE equilibriert. Nach dem Auftragen der in TE gelösten Probe wurden 100 µl Fraktionen gesammelt. Die RNA-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt (nach Cerenkov-Messung) und mit Ethanol gefällt (Kap.2.21.4).

Wurden in den folgenden Versuchen Transkripte voller Länge benötigt, erfolgte die Isolierung der entsprechenden RNA über die Elution aus Polyacrylamidgelen.

2.5.4 Berechnung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten RNA

Die spezifische Aktivität (³²P)-markierter RNA ließ sich über folgende Gleichung in guter Näherung berechnen:

$$\text{spez. Aktivität der RNA} = \frac{1}{\frac{C \cdot D}{B} + \frac{1}{A}} * 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g RNA}$$

- A = spez. Aktivität des radioaktiv markierten UTPs [Ci/mmol]
 B = eingesetzte Menge des markierten UTPs [μCi]
 C = Volumen des Transkriptionsansatzes [μl]
 D = molare Konzentration an unmarkiertem UTP [mM]

Die Nukleotide ATP, CTP und GTP lagen im Überschuß vor (0,3-1mM).

Folgende Näherung ging in die Berechnung mit ein:

$$1 \text{ Ci} = 1.35 * 10^{12} \text{ cpm}$$

(1 μl im Reaktionsgefäß Cerenkov gemessen)

2.6 Detektion RNA-bindender Proteine/Peptide

2.6.1 RNA-Bindung an membranfixierte Proteine (Bowen et al, 1980)

Bindungspuffer	10	mM Tris/HCl
	1	mM Na-EDTA
	je 0,02	% BSA, Ficoll, PVP
	50	mM NaCl

Nach dem Proteintransfer auf Nitrozellulose (Kap.2.3.4) wurde die Membran 15 - 20 min bei 37°C in 200 ml Bindungspuffer inkubiert und anschließend in eine Plastiktasche gelegt, die mit 10 ml 10^6 cpm/ml (^{32}P) markierter RNA in Bindungspuffer gefüllt wurde. Die spezifische Aktivität der RNA betrug 10^6 - 10^9 cpm/ μg RNA. Die genauen Werte sind im Text angegeben.

Die Membran wurde 60 min unter leichtem Schütteln inkubiert und 30 - 60 min dreimal mit je 150 ml Bindungspuffer gewaschen. Falls zum Waschen Bindungspuffer höherer Ionenstärke benutzt wurde, ist dies im Ergebnisteil beschrieben.

Die an Protein gebundene (^{32}P) markierte RNA wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

2.6.2 RNA-Protein Komplexbildung in Lösung (Sapp,Knippers & Richter, 1986)

Reaktionspuffer 200 mM NaCl
 0,2 mM GTP
 30 mM Tris/HCl pH 7,5

(^{32}P) markierte RNA (1-10 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit steigenden Mengen an Protein (0,2-1 mg/ml) 1 h bei 30°C in Reaktionspuffer inkubiert. Nach Magnesiumchlorid-Zugabe ($c_{\text{end}} = 5 \text{ mM MgCl}_2$) bildeten sich die Protein/RNA Partikel aus. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte weitere 30 min bei 30°C.

Die Proben wurden anschließend auf einem 1% Agarose/TAE-Gel aufgetrennt und autoradiographiert.

2.7 Milde Nukleasebehandlung von RNA in Gegenwart von Proteinen

Reaktionspuffer 100 mM NaCl
 1,5 mM MgCl_2
 1 mM CaCl_2
 10 mM Tris/HCl pH 7,5

2 μg RNA wurden von 1-3 u Micrococcus Nuklease (MN) in 30 min bei 37°C unter 1 mM CaCl_2 verdaut.

(^{32}P)markierte RNA (1 $\mu\text{g/ml}$) und Protein (1 mg/ml) wurden 30 min bei RT und 10 min bei 37°C in Reaktionspuffer vorinkubiert, um das Binden des Proteins an die RNA zu ermöglichen.

Nach Zugabe von Micrococcus Nuklease ($c_{\text{end}} = 1 \times 10^6 \text{ u MN/ml}$) erfolgte die Verdauung der RNA bei 37°C. Nach 0, 1, 5, 15 und 30 min wurde den Ansätzen je 1/5 Volumen entnommen und durch Zugabe von EGTA gestoppt ($C_{\text{end}} = 20 \text{ mM EGTA}$).

Die Proben wurden mit Proteinase K behandelt (0,25 mg/ml Prot.K, 15 mM EDTA, 0,5% SDS, 1 h bei 37°C). Die Analyse der RNA erfolgte durch Auftrennung der Ansätze auf einem denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoff-Gel (Kap.2.10.3).

2.8 In vitro Spleißen von hnRNA

2.8.1 Spleißen von β -Globin RNA

(Choi et al., 1986; Konarska et al., 1985;
Grabowski et al., 1985)

Die DNA des β -Globin enthaltenden Plasmids pSP65- β Glob. wurde mit Bam HI linearisiert zur Transkription eingesetzt (Kap.2.5.1; Start der Transkription mit Kappen-Analogem). Die synthetisierte RNA (487 Nukleotide) enthielt ein Intron mit den flankierenden Exons; 17 Nukleotide des zweiten Exons fehlten.

Die Vorläufer RNA wurde entweder direkt oder nach Gelaufreinigung (Kap.2.11.2) unter folgenden Bedingungen gespleißt:

6x10 ⁷ cpm/ml	unaufgereinigte RNA (spez.Akt.:8x10 ⁸ cpm/ μ g)
oder 4x10 ⁶ cpm/ml	aufgereinigte RNA
1.5 mM	ATP
5.0 mM	Creatinphosphat
2.0 mM	MgCl ₂
20 mM	HEPES pH 7,6
44 %	(v/v) Spleißextrakt (Kap.2.2.3)

Der Spleißansatz wurde 30-60 min bei 30°C inkubiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde nach Fällung mit Ethanol (Kap.2.21.4) auf einem 10% Polyacrylamid/Harnstoffgel (Kap.2.10.3) aufgetrennt und autoradiographiert.

2.8.2 Selbstspleißen von Tetrahymena rRNA

Spleißpuffer	200 mM	NaCl
oder	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0.2 mM	GTP
	30 mM	Tris/HCl pH 7,5

Die synthetisierte Tetrahymena RNA (Kap.2.5.2) wurde 1 h bei 30°C in Spleißpuffer vorinkubiert. Wurde dem Ansatz Protein zugesetzt, ist dies im Ergebnisteil angegeben.

Die Spleißreaktion wurde durch Zugabe von Magnesiumchlorid ($C_{\text{end}} = 5$ mM) gestartet und nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt.

Die Analyse der Spleißprodukte erfolgte über ihre Auftrennung auf einem 4% Polyacrylamid/Harnstoffgel und anschließender Autoradiographie.

2.9 Nukleinsäure-Präparation aus HeLa-S3 Zellen

2.9.1 Isolierung von poly A⁺-RNA

HeLa-S3 Zellen wurden, wie in Kap. 2.2.1 beschrieben, in Lysispuffer aufgenommen. Nach Zugabe von Vanadylinhibitor ($c_{\text{end}} = 1 \text{ mM}$) und dem nichtionischen Detergenz NP-40 ($c_{\text{end}} = 0,5\%$) wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und durch 10 Stöße eines engsitzenden Pistills im "Dounce"-Homogenisator aufgebrochen.

Das Lysat wurde zentrifugiert ($600 \times g$, 4°C , 10 min). Der Überstand wurde auf 25 mM EDTA, 0,2% SDS und 0,2 mg/ml Proteinase K gebracht und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit Ethanol gefällt (Kap.2.21.4). Die pelletierte RNA wurde in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA aufgenommen.

Da durch zu starkes Homogenisieren der Zellen Kerne aufgebrochen waren, enthielt die RNA nukleäre DNA. Diese wurde durch Zugabe von DNase verdaut (10 mM MgCl_2 , 2mM Vanadylinhibitor, 1 u/ml RNase-freie DNase I; 15-30 min bei 37°C).

Die Verdauung wurde durch 0,2% SDS und 10 mM EDTA gestoppt, die RNA mit Phenol und Chloroform extrahiert und anschließend gefällt. Die Fraktionierung in polyadenylierte und nicht-polyadenylierte RNA wurde nach der Methode von Aviv und Leder (1975) durchgeführt.

2.9.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der Methode von Blin & Stanford (1976).

Kontaminierende RNA wurde erst bei der Restriktion der DNA entfernt. Den Restriktionsansätzen wurde 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase A zugesetzt (Kap.2.17).

2.10 Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

2.10.1 Agarosegele unter nichtdenaturierenden Bedingungen (Maniatis et al., 1982)

Probenpuffer	1	x	TEB-Puffer
	10	%	Glycerin (v/v)
	0,05	%	Bromphenol Blau
	0,05	%	Xylencyanol
TEB-Puffer	89	mM	Tris-Base pH 8,3
	89	mM	Borsäure
	2	mM	Na-EDTA
TAE-Puffer	40	mM	Tris-Base pH 8,3
	40	mM	Essigsäure
	2	mM	Na-EDTA

Je nach zu erwartender DNA-Fragmentlänge wurde die DNA auf einem 0,8-1,5 % Agarosegel in TEB- oder TAE-Puffer aufgetrennt. Zum Anfärben der DNA enthielt das Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die in Probenpuffer gelöste DNA wurde bei einer angelegten Spannung von 100-150 Volt 1-3 h bei RT auf dem Agarosegel getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Ethidiumbromid-gefärbte Bandenmuster unter UV-Licht fotografiert (Sharp et al., 1973).

2.10.2 Formaldehydgele unter denaturierenden Bedingungen

Probenpuffer	18 % (v/v)	Formaldehyd
	50 % (v/v)	Formamid
	10 % (v/v)	10x MOPS-Puffer
10xMOPS-Puffer	0,20 M	MOPS
	0,05 M	Natriumacetat pH 7,0
	0,01 M	Na-EDTA

Formaldehyd und Formamid wurden mit Amberlite (ohne Gegenion) entionisiert. Die Leitfähigkeiten sollten geringer als 5 µS (für Formaldehyd) bzw. 30 µS (für Formamid) sein.

Auf Formaldehydgelen wurde RNA unter denaturierenden Bedingungen getrennt. Die zu analysierende RNA wurde in Probenpuffer gelöst, 5 min bei 65°C erhitzt und bis zum Auftragen der Probe auf Eis gestellt. Nach Herstellung eines horizontalen Formaldehydgels (16,6% (v/v) Formaldehyd, 1% Agarose, 1 x MOPS-Puffer) wurde die RNA aufgetragen (5-10 µg/Geltasche).

Die RNA wurde 4 h bei einer angelegten Spannung von ca. 100 Volt elektrophoriert.

Die Markerspur wurde vom Gel getrennt, Ethidiumbromid-gefärbt und photographiert. Die zu analysierende RNA wurde durch Elektrophorese aus dem Gel auf Membran gebracht (Kap.2.12.1).

2.10.2 Harnstoff/Polyacrylamidgele unter denaturierenden Bedingungen

Elektrophorese- puffer		TEB-Puffer (siehe Kap.2.10.1)
Gelmischung	8	M Harnstoff
	1	x TEB
	4-10	% (w/v) Acrylamid(40:2)
	0,08	% (w/v) Ammoniumpersulfat
	0,08	% (v/v) TEMED

Die elektrophoretische Auftrennung gespleißter Tetrahymena-RNA erfolgte auf horizontalen 4% Polyacrylamid/8M Harnstoffgelen (18x 16x0,1 cm³). Der Elektrophoresepuffer sowie das Gel enthielten nur 0,4 x TEB-Puffer, da bei dieser Salzkonzentration eine bessere Trennung des zirkulären Introns von der Vorläufer-RNA zu erzielen war.

Die radioaktiv markierte RNA wurde in Formamid mit 0,02% (w/v) Bromphenol Blau/Xylencyanol aufgenommen, in die Geltaschen pipetiert und bei 400 Volt elektrophoriert.

Nach der Elektrophorese wurde eine Glasplatte entfernt, das Gel 30 min in 7,5% Essigsäure vom Harnstoff befreit und anschließend auf DE- und 3MM-Papier übertragen. In einer Bachofer-Geltrocknungsapparatur wurde es mit Saranfolie bedeckt 1 h bei 80°C getrocknet und in einer Metallkassette bei -70°C autoradiographiert. DNA-Proben einer Sequenzierung (Kap.2.20) wurden vor der Gelelektrophorese 3 min bei 95°C denaturiert.

Die Auftrennung erfolgte auf einem 6%Polyacrylamid/Harnstoff-Gradientengel (0,2 - 0,04 mm). Die Präparation und Elektrophorese der Sequenziergele erfolgte analog der bei LKB beschriebenen Methode.

2.11 Elution von Nukleinsäuren aus Gelen

2.11.1 DNA-Elution aus Agarosegelen

Elutionspuffer	300	mM Natriumacetat	pH 7,0
	1	mM EDTA	

Das gelelektrophoretisch getrennte, mit Ethidiumbromid gefärbte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (300 nm) schmalbandig ausgestochen.

Je nach Größe des Fragments wurde das Gelstück 15-30 min in Elutionspuffer equilibriert und anschließend in ein 0,5ml Reaktionsgefäß überführt, welches in der Spitze eine kleine Öffnung aufwies, die mit einem Glaswollepfropfen abgedichtet war. Das Gelstück wurde mechanisch zerkleinert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die 0,5 ml Gefäße wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und in gefrorenem Zustand zentrifugiert (16.000 x g, 15 min, RT). Nach der Zentrifugation befand sich in dem 1,5ml Reaktionsgefäß die DNA-Lösung. Diese wurde zweimal Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt (Kap.2.21.4).

Nach Zentrifugation und Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und in TE aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde abgeschätzt, indem ein Aliquot der Lösung neben bekannten Mengen einer DNA gelelektrophoretisch getrennt und gefärbt miteinander verglichen wurden.

2.11.2 RNA-Elution aus Polyacrylamidgelen

RNA-Elutionspuffer	500 mM Ammoniumacetat pH 7,0
	0,1 % SDS
	0,1mM Magnesiumacetat

Wurden für Experimente mit (^{32}P)-markierten in vitro Transkripten (Kap.2.5) RNAs voller Länge benötigt, wurde der Transkriptionsansatz (in 2-3 Slots) neben einem Längenmarker auf einem 3-6% Polyacrylamid/Harnstoffgel aufgetrennt (Kap.2.10.3). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Glasplatte entfernt, das Gel mit Saranfolie bedeckt und mit Markerpunkten versehen 10-60 min bei RT autoradiographiert.

Die entsprechende RNA-Bande wurde aus dem Gel ausgestochen, in einem Reaktionsgefäß zerkleinert und in RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 4°C eluiert. Das Eluat wurde abgenommen und Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde mit Ethanol ausgefällt.

2.12 Transfer elektrophorierter Nukleinsäuren auf Membranen

2.12.1 Elektro-Transfer von RNA

Transfer-Puffer 3,1 mM Citronensäure
 4,0 mM Na_2HPO_4 pH 4,5

Das RNA-Gel (Kap.2.10.2) wurde 10 min in Transferpuffer geschüttelt. Der Transfer der RNA auf Nylonmembran (Hybond N, Amersham) erfolgte in einer Elektrotransferkammer von Biorad. Es wurde bei 0-4°C zuerst 1 h bei 40 Volt , dann 3 h bei 80 Volt elektrophoriert. Die "Northern"-Membran wurde nach Markierung der Geltaschen zur Fixierung der RNA 1 h bei 80°C gebacken.

2.12.2 Diffusionstransfer von DNA

Denaturierungs- 1,5 M NaCl
lösung 0,5 M NaOH

Neutralisierungs- 1,5 M NaCl
lösung 0,5 M Tris/HCl pH 7,5

20 x SSC 3,0 M NaCl
 0,3 M Na-Citrat pH 6,8

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von DNA wurden die Agarsegele 30 min in Denaturierungslösung und zweimal 20 min in Neutralisierungslösung geschüttelt.

Durch gerichtete Diffusion wurde die denaturierte DNA in 20 x SSC aus dem Gel auf Nylonmembran transferiert. Die Transferdauer variierte zwischen 4 h bis 16 h (je nach Größe der zu transferierenden Fragmente). Die DNA wurde durch einstündiges Backen der Membran bei 80°C fixiert.

2.13 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.13.1 5'-Endmarkierung von Oligodesoxyribonukleotiden (Richardson, 1965)

PNK-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5
 10 mM MgCl_2
 5 mM DTT

Nach der Methode von Richardson (1965) wurden Oligodesoxyribonukleotide radioaktiv markiert. T4-Polynukleotidkinase übertrug radioaktiv markiertes Phosphat von γ -(^{32}P) ATP auf die 5'-OH Gruppe des Oligodesoxyribonukleotids. Der Reaktionsansatz enthielt γ -(^{32}P)ATP im 2-3 fachen molaren Überschuß in Bezug auf die eingesetzten Oligonukleotide. Die Kinasierung erfolgte in PNK-Puffer mit 1-5 u T4-Polynukleotidkinase/10 pMol Oligonukleotid. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Oligonukleotide über eine DE 52-Säulenchromatographie aufgereinigt (Snyder, 1964).

2.13.2 Hexanukleotid-gestartete 2.Strangsynthese (Feinberg & Vogelstein, 1982)

OL	90 OD/ml Hexanukleotide in TE
	Mischung von Oligodesoxyribonukleotiden (produziert durch pankreatische Desoxyribonuklease-Behandlung von Kalbsthymus DNA)
DTM	250 mM Tris/HCl pH 7,9
	25 mM MgCl_2
	50 mM β -Mercaptoethanol
je	100 mM dGTP, dCTP und dTTP
LS	25 % (v/v) DTM
	25 % (v/v) OL-Puffer
	7 % (v/v) 1M HEPES pH 6,6
	43 % (v/v) H_2O

60-100 ng DNA wurden 5 min bei 95°C denaturiert und mit 0,4 mg/ml BSA, 46% (v/v) LS und 50 μCi α -(^{32}P)dATP versetzt. Durch Zugabe von Klenow-Enzym (100u/ml) wurde die Reaktion gestartet. Nach 3 stündiger Inkubation bei 37°C reinigte man die DNA über Gelfiltration auf (siehe Kap.2.5.3).

2.14 Nukleinsäurehybridisierung

2.14.1 Hybridisierung mit cDNA

Hybridisierungs-	4	x SET
lösung	5	x Denhardt's
	0,1	% Natriumpyrophosphat
	0,2	% SDS
	10	$\mu\text{g/ml}$ Lachssperma DNA

Nach DNA-Transfer und ihrer Fixierung auf Nylonmembran (Kap.2.12) wurden die Filter 2-4 h bei 65°C mit Hybridisierungslösung inku-

biert, um unspezifische Bindung der Hybridisierungsprobe zu minimieren.

Die Lösung wurde anschließend erneuert und mit $0,1-1 \times 10^7$ cpm/ml hitzedenaturierter, radioaktiv markierter cDNA versetzt (Kap.2.13.2; spez.Aktivität der DNA: $0,5-1 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA). Die Filter wurden 4-16 h bei 65°C inkubiert. Die unspezifisch gebundene DNA wurde mit $1 \times$ SSC/0,1% SDS bei 65°C abgewaschen; die spezifisch gebundene DNA wurde durch Autoradiographie der Membranen nachgewiesen.

Bei Hybridisierungen gegen membranfixierte RNA oder genomische DNA enthielt die Hybridisierungslösung zusätzlich 50% (v/v) entionisiertes Formamid. Die Hybridisiertemperatur betrug in diesen Fällen 42°C.

Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.14.2 Hybridisierung mit Oligodesoxyribonukleotiden

Hybridisierungs-	6	x	NET
lösung	5	x	Denhardt's
	0,1	%	SDS
	0,2	mg/ml	Lachssperma-DNA

Die membranfixierten Nukleinsäuren wurden 2-4 h bei 65°C mit der angegebenen Lösung vorhybridisiert. Die Membranen wurden in neue Hybridisierungslösung überführt, die (32 P)markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von $1-6 \times 10^6$ cpm/ml enthielt (Kap.-2.13.1). Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den Schmelzpunkten der eingesetzten Oligodesoxyribonukleotide.

Nach Suggs et al. (1981) läßt sich der Schmelzpunkt (T_M) von Oligonukleotiden, die eine Länge von 15-20 Basen besitzen, in guter Näherung mit folgender Gleichung berechnen:

$$T_M = 4 \times \sum (G+C) + 2 \times \sum (A+T)$$

Bei Sequenzgemischen wurde der T_M -Wert des A/T-reichsten Oligonukleotids berechnet. Die Hybridisierungstemperatur lag 5-10°C unter dem errechneten Schmelzpunkt.

Nach 6-16 stündiger Hybridisierung wurden die Membranen bei gleicher Temperatur mit $6 \times \text{SSC} / 0,1\% \text{ SDS}$ gewaschen und autoradiographiert.

2.15 Isolierung sequenzspezifischer λ -Phagen aus einer cDNA-Bank

Für die Isolierung eines A2-spezifischen λ -Phagens standen zwei HeLa cDNA-Bibliotheken zur Verfügung:

Bakteriophage	Wirtstamm	Herkunft
λ gt 11	Y 1088 ^{Amp}	R.Knippers, Konstanz
λ gt 10	RY 1073	H.Werr, Bochum

2.15.1 Titerbestimmung eines λ -Phagenlysats

Zur Titerbestimmung der hochtitrigen Phagenlysate wurde 1 μl der Phagenlösung mit 10^5 , 10^6 und 10^7 fach verdünnt.

Mit je 1 μl der Verdünnungen in 100 μl SM wurden 150 μl einer Übertagkultur des entsprechenden Bakteriums infiziert. Die Proben wurden 15-20 min bei 37°C inkubiert, in 4 ml 45°C heiße Topagarose pipettiert, durchmischt und auf kleinen LB/Mg-Platten verteilt. Nach der Verfestigung der Topagaroseschicht wurden die Platten (mit der Agarschicht nach oben) 8-16 h bei 37°C bebrütet.

Der Titer der Lysate wurde bestimmt, indem man die Plaques (pfu) pro Platte auszählte und auf die unverdünnte Phagenlösung hochrechnete. Der Titer wurde als pfu/ml Phagenlysate angegeben (pfu = plaque forming units).

2.15.2 Ausplattieren einer cDNA-Bank

Ausgehend von dem bestimmten Phagentiter der cDNA-Bank wurden $1,5 \times 10^5$ Phagen (pfu) auf 6 großen LB/Mg-Platten ausplattiert; Die Infektion der Bakterien, das Ausplattieren und die Inkubation bei 37°C erfolgte wie in Kap.2.15.1 beschrieben unter Verdopplung der Ansätze.

Bei einem Plaque-Durchmesser von 1-2 mm wurden die Platten aus dem 37°C-Brutschrank entfernt und bei 4°C gelagert.

2.15.3 Plaque-Transfer auf Nylonmembranen (Benton & Davis, 1977)

Unter sterilen Bedingungen wurden auf die gekühlten LB/Mg-Platten Nylonmembranen blasenfrei aufgelegt. Mit einer heißen Injektionsnadel wurden Markierungspunkte durch die Membran in die Agarschicht gestochen.

Nach 1-2 min wurde die Membran mit sterilen Pinzetten von der Platte abgehoben und umgekehrt auf Whatman-Papier gelegt, das mit Denaturierungslösung getränkt war. Die Denaturierungsdauer betrug 5-7 min. Anschließend wurde der Filter 2 x für je 3-5 min mit Neutralisierungslösung und 3 min mit 2 x SSC inkubiert. Die Inkubation mit den entsprechenden Puffern erfolgte auf Whatman-Papier. (Die Zusammensetzung der Puffer ist in Kapitel 2.12 angegeben.)

Es wurden von jeder Platte zwei Filterabzüge angefertigt, wobei darauf zu achten war, daß die Markierungen beider Filter übereinstimmten. Zur Fixierung der Phagen-DNA wurden die Nylonmembranen 1 h bei 80°C gebacken.

2.15.4 In situ Hybridisierung transferierter Phagen-DNA

Die in situ Hybridisierung erfolgte nach der in Kap.2.14 beschriebenen Methode.

2.15.5 Vereinzelung und Isolierung der sequenzspezifischen Phagen

Nach Autoradiographie der hybridisierten Membranen wurden die erhaltenen Signale auf die LB/Mg-Platten übertragen. Mit dem großen Ende steriler Pasteurpipetten wurden die dem Signal entsprechenden Bereiche ausgestochen und in 0,5 ml SM/20 µl Chloroform überführt. Die Elution der Phagen erfolgte über Nacht bei 4°C. In einer 1:1000 Verdünnung wurden die Phagen auf kleinen LB/Mg-Platten ausplattiert, auf Membranen transferiert und gegen ihre DNA in situ hybridisiert (Kap. 2.15.2 - 2.15.4).

Die Plaques, die den Signalen der Autoradiographie entsprachen, wurden mit der Spitze einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, über Nacht bei 4°C in 300 µl SM/20 µl Chloroform eluiert und zur zweiten Feinanreicherung in 1:1000 Verdünnung ausplattiert. Die Phagenplaque-Dichte auf der Platte sollte so gering sein (100-300 pfu/Platte), daß nach Hybridisierung und Autoradiographie isolierte, Signalen entsprechende Plaques gestochen werden konnten.

Von den singulären Phageneluaten wurden hochtitrige Lysate hergestellt und ihre DNA zur weiteren Charakterisierung isoliert (Kap. 2.16).

2.16 Analytische und präparative Isolierung von Vektor-DNA

2.16.1 Plasmid-Isolierung (Birnboim & Doly, 1979)

Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Die analytische Plasmid-Isolierung ('small scale isolation') lieferte ausreichende DNA-Mengen (1-2 µg), um eine Kloncharakterisierung durch Restriktion vornehmen zu können. Die Plasmid-Minipräparation erfolgte nach der Versuchsvorschrift von Maniatis et al. (1982).

Für größere DNA-Mengen wurden bis zu 1 Liter Bakterienkultur aufgearbeitet ('large scale isolation'). Die präparative Plasmid-Isolierung und -Aufreinigung wurde, wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben, durchgeführt.

2.16.2 Präparation von Bakteriophagen-DNA (Leder et al., 1977; Yamamoto et al., 1970)

Die Isolierung von λ-Phagen-DNA erfolgte unter sterilen Bedingungen. Eine ÜN-Kultur des Bakterienstamms RY 1073 wurde 1:1000 mit NZ-Medium/0,1% Maltose verdünnt und 6-7 h bei 37°C geschüttelt.

Für eine analytische DNA-Aufarbeitung wurden 300 µl dieser ÜT-Kultur mit 300 µl SM und 1 µl eines 200 µl Phagenplaque-Eluats (Kap. 2.15.5) gemischt. Die Bakterieninfektion erfolgte durch Inkubation der Ansätze bei 37°C. Nach 15-20 min wurden die Proben in Reagenzgläser überführt, die mit 5 ml NZ-Medium gefüllt waren,

und schüttelte sie über Nacht bei 37°C (Schüttlergeschwindigkeit: 150-170 rpm).

Die kleinen Lysate wurden mit 50 µl Chloroform versetzt und weitere 10 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterientrümmen wurden durch Zentrifugation pelletiert (16.000 x g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden in neue Röhrchen überführt und mit je 1 µg/ml RNase A und DNase I versetzt. Die bakteriellen Nukleinsäuren wurden 1 h bei 37°C verdaut. Die Bakteriophagen fällte man mit 7,5% (w/v) PEG und 0,75 M NaCl bei 4°C aus. Nach einer Stunde wurden die Phagen pelletiert (16.000 x g, 15 min, 4°C) und in 300 µl SM resuspendiert. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen extrahierte man die Suspension mit 1 Volumen Chloroform, versetzte die wässrige Phase mit 50 mM EDTA und 2,5 % SDS und inkubierte die Proben 10 min bei 65°C. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit Phenol und Chloroform, zuletzt einmal mit Chloroform (je 400 µl) extrahiert. Die Bakteriophagen-DNA wurde mit Ethanol gefällt (Kap.2.21.4).

Für die präparative Aufarbeitung von Bakteriophagen-DNA wurden 1,5 ml einer ÜT-Bakterienkultur RY 1073 mit 1 ml SM gemischt. Zur Bakterieninfektion wurden 10 µl eines 200 µl Phagenplaque-Eluates zugesetzt, und die Probe 15 min bei 37°C inkubiert. Der Infektionsansatz wurde in 200 ml NZ-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt (160 rpm).

Das große Lysat wurde mit 18 g NaCl versetzt und nach Lösen des Salzes zentrifugiert (11.000 x g, 10 min, 4°C). Die Bakteriophagen wurden mit 7,5% PEG bei 4°C aus dem Überstand ausgefällt und nach einer Stunde pelletiert (11.000 x g, 15 min, 4°C). Das möglichst PEG-freie Pellet wurde in 3 ml SM resuspendiert und in einem 10 ml Reagenzglas zweimal mit je 1 Volumen Chloroform extrahiert. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation beschleunigt (11.000 x g, 5 min, 4°C). Die Phagensuspension wurde auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen (1 ml 1,7 g/ml; 1,5 ml 1,5 g/ml; 1,5 ml 1,4 g/ml CsCl) und im SW40-Rotor zentrifugiert (22.000 rpm, 2 h, 20°C).

Die Phagenbande wurde im kleinstmöglichen Volumen abgenommen und 1 h gegen SM dialysiert. Die Lösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, auf 50 mM EDTA, 0,5% SDS gebracht und 15-20 min bei 65°C inkubiert. Nach anschließender Phenol/ Chloroform-Extraktion wurde die DNA-Lösung über Nacht bei 4°C gegen TE dialysiert.

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt (Kap.2.21.3).

Bei der DNA-Isolierung von λ gt11-Phagen wurde dem NZ-Medium außer 0,1% Maltose 50 μ g/ml Ampicillin zugesetzt, da das Wirtsbakterium Y 1088 dieses Resistenzgen trägt. Die weitere Aufarbeitung entsprach der oben beschriebenen Methode.

2.17 Restriktion von DNA

(Maniatis et al., 1982; Roberts, 1982)

1-2 μ g DNA wurden mit der benötigten Menge des Restriktionsenzym in einem Volumen von 20-50 μ l für 1-2 h verdaut. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen.

Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Erhitzen der Probe auf 65°C gestoppt. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte auf Agarosegelen (Kap.2.10.1).

2.18 Klonieren in M13

Ligationspuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,6
 5 mM $MgCl_2$
 5 mM DTT
 1 mM ATP

Das zu sequenzierende DNA-Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert (Kap.2.11.1). Die M13mp18- bzw. M13mp19-DNA wurde komplementär restringiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. 50 ng M13-DNA wurden mit dem 3fachen molaren Überschuß an "Insert"- Fragment versetzt und 5 min auf 65°C erhitzt. In einem Reaktionsvolumen von 20 μ l wurde die DNA mit 1-4 u T4-DNA Ligase in 1 x Ligationspuffer über Nacht bei 12°C inkubiert.

Der halbe Ligationsansatz wurde mit 100 µl 0,1 M CaCl_2 und 200 µl CaCl_2 -kompetenten JM 109-Zellen versetzt (Mandel & Higa, 1970) und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 30 µl 0,1M IPTG und 2% X-Gal (in DMF), sowie 50 µl einer JM 109 ÜT-Kultur wurde der Ansatz mit 3 ml Weichagar (42°C) gemischt und auf kleinen LB/Mg-Platten verteilt. Die Platten wurden nach dem Aushärten des Weichagars über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Es wurden pro Ligation drei klare M13-Plaques gestochen und in 100-200 µl SM eluiert.

2.19 Isolierung doppel- und einzelsträngiger M13-DNA

Zur Isolierung doppelsträngiger M13-DNA wurden 50 µl JM 109-ÜN-Kultur mit 1/10 Volumen des M13-Plaques in 3 ml LB-Medium gegeben und 3-5 h bei 37°C geschüttelt.

Die Aufarbeitung entsprach der Plasmid-Minipräparation nach der Methode von Maniatis et al. (1982) (Kap.2.16.1).

Nach der Restriktionsanalyse wurden die M13-Eluate zur Einzelstrang-Aufarbeitung ausgewählt, die das gewünschte, zu sequenzierende DNA-Fragment enthielten. 3 ml LB-Medium wurden mit 50 µl einer JM103-ÜN-Kultur und 20 µl des 200 µl M13-Plaque-Eluates versetzt und 5-7 h bei 37°C geschüttelt. Je Probe wurden 1,5 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (16.000 x g, 10 min, RT), und 1,3 ml des Überstands mit 150 µl 25% PEG/2 M NaCl versetzt.

Nach einstündiger Inkubation in Eiswasser wurde die einzelsträngige M13-DNA pelletiert (16.000 x g, 15 min, RT). Das DNA-Pellet wurde in 200 µl TE resuspendiert, 2 x mit Phenol/Chloroform und 1 x mit Chloroform extrahiert. Die einzelsträngige M13-DNA wurde mit Ethanol gefällt (Kap.2.21.4) und in 10 µl TE aufgenommen.

1 µl der DNA-Lösung wurde neben bekannten DNA-Mengen auf einem 1% Agarosegel elektrophoriert. Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde unter UV-Licht photographiert. Die Konzentration der M13-DNA wurde durch Vergleich mit den Standards abgeschätzt.

2.20 DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977)

5 x Sequenasepuffer	200	mM	Tris/HCl	pH 7,5
	100	mM	MgCl ₂	
	250	mM	NaCl	
M13-"Primer"	0,5	pmol/μl		
5 x LM	7,5	μM	dGTP	
	7,5	μM	dCTP	
	7,5	μM	dTTP	
ddNTP-Terminationsmix	80	μM	dATP	
	80	μM	dGTP	
	80	μM	dCTP	
N = A, G, C oder T	80	μM	dTTP	
	50	mM	NaCl	
	8	μM	ddNTP	
Stop-Lösung	95	%	(v/v) Formamid	
	20	mM	EDTA	
	0,05	%	Bromphenol Blau	
	0,05	%	Xylencyanol	

In einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden 1 μl M13-"Primer", 2 μl Sequenasepuffer und ca. 1 μg einzelsträngiger M13-DNA gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert. Zur besseren Hybridisierung des "Primers" an die DNA wurde der Reaktionsansatz langsam abgekühlt. In der Zwischenzeit pipettierte man in die vorbereiteten A, G, C und T -Reaktionsgefäße je 2,5 μl des entsprechenden Terminationsmixes und inkubierte sie bei 37°C.

Dem abgekühlten Hybridisierungsansatz (T<35°C) wurden folgende Reagenzien zugefügt:

10	μl Hybridisierungsansatz
1	μl 0,1 M DTT
2	μl 1 x LM
0.5	μl α-(³⁵ S)dATP (10 Ci/ml; 600 Ci/mmol)
2	μl Sequenase (1:8 mit TE verdünnt; Tabor et al., 1987)

Die Reaktion wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 x je 3,5 μl in die vorgewärmten Terminationsgefäße (A, G, C und T) pipettiert. Die Terminationsreaktion wurde nach 5-10 min bei 37°C durch Zugabe von 4 μl Stop-Lösung beendet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Zur Sequenzanalyse wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und auf einem 4% Polyacrylamid/7 M Harnstoffgel (Kap.2.10.3)

elektrophoriert. Nach der Vorschrift von der Firma LKB wurde ein 0,2-0,4 mm Gradientengel angefertigt, welches in dem "2010 Macro-phor Sequencing System" von LKB elektrophoriert wurde. Je 2-3 μ l der Sequenzierungsproben wurden in der Reihenfolge A/G/C/T unter Benutzung eines "Haifischzahn-Kamms" nebeneinander auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 2.000 Volt 2-4 h aufgetrennt.

Die Sequenzierungsgele wurden danach 2 x 30 min in 7,5% Essigsäure langsam geschüttelt, um den Harnstoff zu entfernen, und 1 h bei 80°C getrocknet. Ein aufgelegter Röntgenfilm wurde für 16 h bei RT exponiert und entwickelt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Micro Genie-Programm der Firma Beckman auf einem IBM-Personal Computer (Queen & Korn, 1984).

2.21 weitere Techniken

2.21.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Die Bindung von Protein an das Farbreagenz Coomassie Blau (Brillant Blue G-250) bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm.

Bei 595 nm wurde die Absorption der mit Protein versetzten Bradford-Lösung gegen einen Blindwert gemessen.

2.21.2 Fällung von Proteinen

Die Proteine wurden in Gegenwart von 0,3 M LiCl und 70% (v/v) Ethanol gefällt. Nach 2 h bei -20°C oder 30 min bei -70°C wurden die Proteine pelletiert (16.000 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, 1 min im Ölpumpenvakuum getrocknet und in Puffer aufgenommen (siehe Ergebnisteil).

2.21.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

In einem Zeiss-Spektralphotometer wurde die Absorption nukleinsäurehaltiger Lösungen bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren in der Lösung ließ sich über folgende Gleichungen berechnen:

$$\begin{aligned}1 \text{ A}_{260} &= 50 \text{ } \mu\text{g DNA/ml} \\&= 40 \text{ } \mu\text{g RNA/ml} \\&= 33 \text{ } \mu\text{g Oligonukleotid/ml}\end{aligned}$$

Die Nukleinsäurelösung wurde bei einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von ≥ 2 als proteinfrei angesehen.

Von den gemessenen Werten wurde die Absorption des reinen Lösungsmittels abgezogen.

2.21.4 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurelösungen wurden mit LiCl oder Natriumacetat ($c_{\text{end}} = 0,3 \text{ M}$) und Ethanol ($c_{\text{end}} = 70\text{-}75\% \text{ (v/v)}$) versetzt. Die Fällungsdauer betrug 15-30 min bei 4-25°C. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation pelletiert (16.000 x g, 15 min, RT), 2 x mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, 1 min im Ölpumpenvakuum getrocknet und in TE oder H_2O gelöst.

3. Ergebnisse

3.1 Proteinzusammensetzung der Kernextrakte

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten wurden Zellkernextrakte aus HeLa S3-Zellen und Rinderlymphozyten eingesetzt (siehe Kap.2.2).

In Anlehnung an die Versuchsvorschrift zur Isolierung von hnRNP-Partikeln aus HeLa-S3 Zellen (Samarina et al., 1968) wurde von Wilk et al. (1985) eine Methode zur Präparation von hnRNP-Komplexen aus Rinderlymphozyten entwickelt (Kap.2.2.2).

Zu ihrer Charakterisierung wurden die Proteingemische zweidimensional elektrophoriert (Kap.2.3.2).

Das Proteinmuster der 40S sedimentierenden RNP-Proteine nach zweidimensionaler Gelelektrophorese unter NEPHGE-Bedingungen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Nomenklatur der Core-Proteine ist unter Angabe der isoelektrischen Punkte und der Molekulargewichte in Abb.1; A angegeben.

Folgende Unterschiede sind durch den Vergleich der Core-Proteine aus stimulierten Rinderlymphozyten (Abb.1.B) und HeLa-S3 Zellen (Abb.1.C) festzustellen:

1. Die hnRNP-Präparation aus stimulierten Rinderlymphozyten enthält kein D4-Protein und nur geringe Spuren der Coreproteine C3 und C3x.
2. Die hnRNP-Proteine aus Rinderlymphozyten sind stärker modifiziert. Das Auftreten dieser Ladungsisomere ist teilweise durch Phosphorylierung und möglicherweise durch Acetylierung der Proteine zu erklären (Henrich et al., 1985).

Bei der Präparation von Spleißextrakt aus HeLa-S3 Zellen nach der Methode von Dignam et al. (1983) lassen sich keine hnRNP-Proteine durch Coomassie Blau-Färbung nachweisen(siehe Abb.1.D).

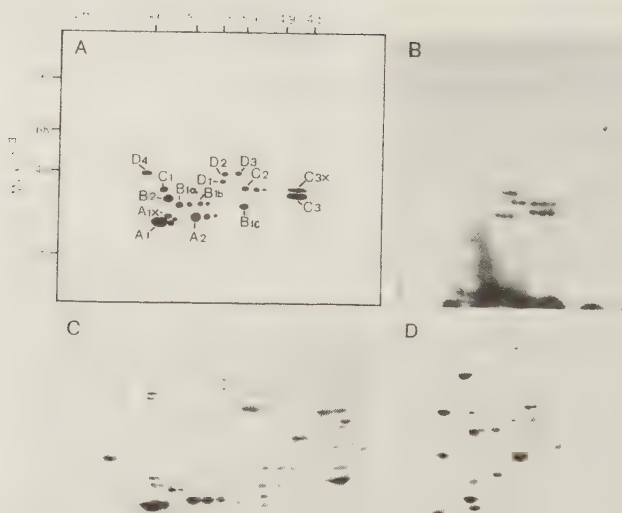


Abb.1

Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen aus Zellkernextrakten im NEPHGE-System

Der Kernextrakt aus stimulierten Rinderlymphozyten und HeLa-S3 Zellen wurde über Zonenzentrifugation aufgereinigt. Die Fraktionen des 40S-Maximums wurden vereinigt, ethanolgefällt und 200 µg Protein im NEPHGE-System elektrophoriert (s. Kap. 2.3.2).

Der Spleissextrakt aus HeLa-S3 Zellen (Kap. 2.2.3; 200 µg Protein) wurde nach Ethanolfällung wie beschrieben elektrophoriert.

- A. schematisches Muster der Core-Proteine mit Nomenklatur und pI-Standardisierung
- B. 40S RNP-Proteine aus ConA-stimulierten Rinderlymphozyten
- C. 40S RNP-Proteine aus HeLa-S3 Zellen
- D. Proteine des Spleissextrakts aus HeLa-S3 Zellen

3.2 RNA-Bindungseigenschaften der hnRNP-Proteine

Die Bindung der Core-Proteine an hnRNA wurde durch RNA-Bindungstests an membranfixierte Einzelproteine und Peptide, sowie durch Untersuchungen der Protein/RNA-Komplexbildung in Lösung charakterisiert.

3.2.1 RNA-Bindungstests an zweidimensional aufgetrennte Coreproteine aus Rinderlymphozyten

40S RNP-Proteine aus Rinderlymphozyten wurden nach zweidimensionaler Gelelektrophorese entweder elektrisch oder durch Diffusion auf Nitrozellulose transferiert. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Fähigkeit der membranfixierten Proteine, RNA zu binden, von der Art des Transfers abhängig ist (Henrich, 1985).

Die transferierten Proteine wurden mit (^{32}P)markierter β -Globin RNA 2 Stunden bei RT inkubiert und mit Bindungspuffer steigender Ionenstärke gewaschen. Die Autoradiographien sind in Abbildung 2 zu sehen.

Der Vergleich der RNA-Bindungseigenschaften an die Proteine nach Elektro- (E) und Diffusionstransfer (D) läßt eine höhere RNA-Bindungskapazität für elektrisch transferierte Proteine erkennen.

Die RNA-Bindungsfähigkeiten waren identisch, wenn die Proteine nach Elektrotransfer mit höherer Stringenz gewaschen wurden ($E_{100 \text{ mM NaCl}} = D_{50 \text{ mM NaCl}}$). Bei niedriger Waschstringenz (E_{50}) zeigten alle basischen Coreproteine die Fähigkeit, RNA zu binden (Vergleich mit Abb.1, B). Mit steigender Ionenstärke des Waschpuffers verschwand zuerst die RNA-Bindung an die Gruppe der B-Proteine (D_{100} , E_{150}), dann die Bindung der RNA an die RNP-Proteine A1 und A2 (D_{150}).

Die stärkste RNA-Bindung zeigte das Coreprotein C1 und eine Proteingruppe, die nicht zu den Coreproteinen zählt (M_r : ca.55 kd, $pI_{app.} = 7,3 - 8,3$) (siehe Abb.2, D_{150}).

Das RNA-Bindungsexperiment an die RNP-Proteine aus HeLa-S3 Zellen lieferte ein anderes Ergebnis (Henrich, 1985). Die Coreproteine A1, A2 und B1a zeigten die stärkste RNA-Bindungsfähigkeit. Die stärkere Modifizierung der Coreproteine aus Rinderlymphozyten könnte für das veränderte Bindungsverhalten verantwortlich sein.

L 50

D 50



Abb.2

Autoradiographien der RNA-Bindung an membranfixierte 40S RNP-Proteine aus stimulierten Rinderlymphozyten

40S-Proteine wurden im NEPHGE-System 2D gelelektrophoretisch getrennt und elektrophoretisch (E) oder durch Diffusion (D) auf Nitrozellulose transferiert.

Die Proteinproben wurden mit (^{32}P) markierter RNA inkubiert (siehe Kap.2.6.1; spez. Aktivität der RNA: 1×10^6 cpm/ μg RNA; eingesetzte Radioaktivitätsmenge: 1×10^6 cpm/ml Bindungspuffer).

Die Proben wurden anschließend mit Bindungspuffer steigender Ionenstärke gewaschen:

50 mM NaCl/Bindungspuffer	(Belichtungszeit: 4 h)
100 mM NaCl/Bindungspuffer	(Belichtungszeit: 16 h)
150 mM NaCl/Bindungspuffer	(Belichtungszeit: 16 h)

3.2.2 RNA-Bindungsstudien an membranfixierte V8-Peptide der Core-Proteine A1, A2 und C3 aus HeLa-S3 Zellen

Um die RNA-Bindungsstelle der Core-Proteine A1, A2 und C3 aus HeLa-S3 Zellen näher zu charakterisieren, wurden die Proteine einer limitierten V8 Protease-Behandlung unterzogen. Die entstandenen Peptide wurden auf einem 15% Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und RNA-Bindungstests unterworfen.

Die Autoradiographien der einzelnen Versuche sind in Abb.3 zu sehen.

Diese Versuchsreihe enthielt zwei Variablen:

1. Art des Proteintransfers auf Nitrozellulose (A, B, C)
2. Zusammensetzung des Bindungspuffers (a, b, c, d)

In Abhängigkeit von der Transfermethode sind nur für die A2-Peptide auffällige Unterschiede in der RNA-Bindungsfähigkeit zu sehen. Wurden die Peptide des A2-Proteins durch Elektrotransfer in SDS-freiem Elektrophoresepuffer auf Nitrozellulose transferiert, zeigten sie starkes RNA-Bindevermögen; nach Diffusionstransfer oder elektrischem Transfer in SDS-haltigem Puffer war die RNA-Bindung stark reduziert.

Die Zugabe von ATP (a) oder NTPs (b) (je 0,5 mM) hatte keinen Einfluß auf die RNA/Peptid-Bindung. Das ist ein Hinweis, daß zur RNA/Protein-Komplexbildung keine Energie benötigt wird. In Anlehnung an in vitro Spleißbedingungen (Kap.2.8.1) wurde in Versuch c Bindungspuffer eingesetzt, der Magnesiumchlorid (3,2 mM) enthielt (anstelle von EDTA). Unter diesen Bedingungen zeigt das C3-II Peptid keine Fähigkeit mehr, RNA zu binden (Vergleich A.o mit d); die RNA-Komplexierung der A2-Peptide ist reduziert (B.d), wenn nicht aufgehoben (A.d; C.d).

Vergleicht man in dieser Versuchsreihe alle stark RNA-bindenden Peptide, lassen sich die RNA-Bindungsdomänen der Coreproteine A1, A2 und C3 in den Peptiden A1-II, A2-II und C3-I /C3-II lokalisieren (siehe Abb.16, Peptidkarten der Core-Proteine A1, A2 und C3).

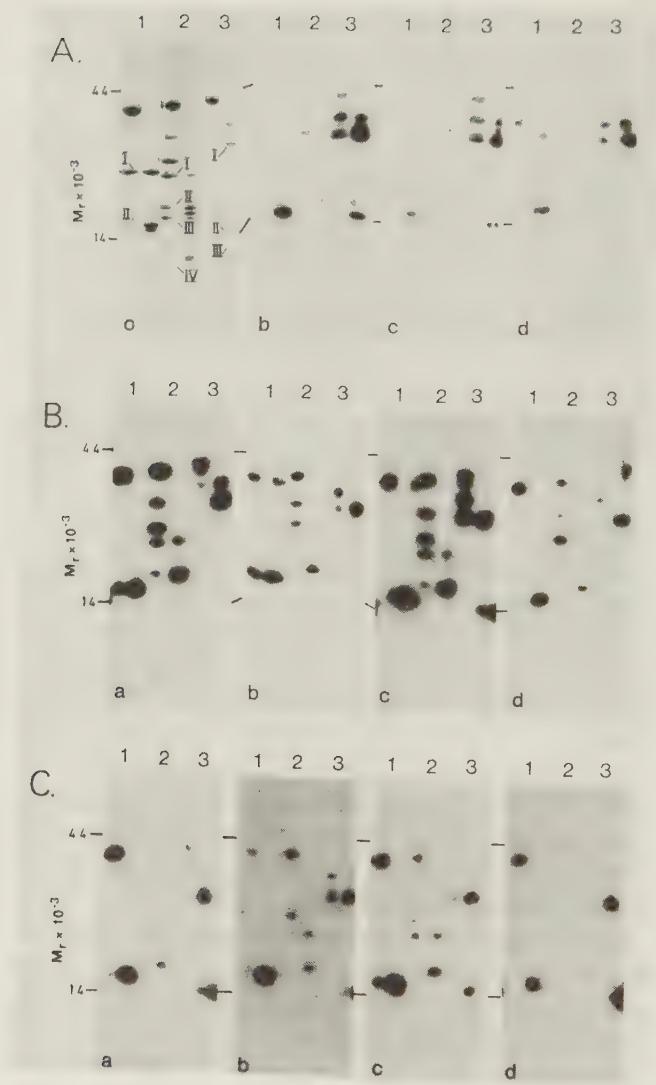


Abb.3

Autoradiographien der RNA-Bindung an membranfixierte V8-Peptide der Coreproteine A1, A2 und C3 aus HeLa-S3 Zellen

Die Coreproteine A1 (1), A2 (2) und C3 (3) wurden aus 2D Gelen ausgestochen und (je 8-10 μ g Protein) in einem 15% Polyacrylamidgel mit 5 ng/150 ng V8 Protease verdaut (siehe Kap.2.4).

Als Marker wurden die Proteine Lysozym und Ovalbumin elektrophoriert.

A.O Peptidmuster der Coreproteine A1, A2 und C3
(Peptidkarten: siehe Abb.16)

Die getrennten Peptide wurden unter folgenden Bedingungen auf Nitrozellulose transferiert (Kap.2.3.4):

- A. Elektrotransfer mit SDS
- B. Elektrotransfer ohne SDS
- C. Diffusionstransfer

Die membranfixierten Peptide wurden mit (³²P)markierter RNA in den angegebenen Bindungspuffern inkubiert, mit 50 mM NaCl/Bindungspuffer gewaschen und autoradiographiert (Belichtungszeit: 4 h; siehe Kap.2.6.1).

- a. 0,5 mM ATP/Bindungspuffer
- b. 0,5 mM NTP/Bindungspuffer
- c. 1 x Bindungspuffer
- d. 3,2 mM MgCl₂/Bindungspuffer

3.2.3 Protein/RNA-Komplexbildung in Lösung

Die RNA-Bindungstests an membranfixierte Proteine oder Peptide haben gezeigt, daß die Transfermethode einen Einfluß auf die RNA/Protein-Komplexbildung hat. Um diesen Einfluß zu eliminieren, wurde die Komplexbildung von RNA mit einzelnen Coreproteinen in Lösung untersucht.

Sapp et al. (1986) führten Bindungsstudien des Proteins UP1 an einzelsträngige DNA durch. Da das UP1-Protein ein proteolytisches Spaltprodukt des A1-Proteins ist (Riva et al., 1986), wurde die Methode von Sapp et al. (1986) auf die Core-Proteine übertragen. Da die Ergebnisse der RNA/Protein-Komplexbildung die Grundlage für Experimente zum Einfluß der Coreproteine auf das Selbstspleißen der Tetrahymena rRNA bilden sollten, wurde Reaktionspuffer eingesetzt, der 5 mM Magnesiumchlorid enthielt (Kap.2.6.2). Unter diesen Bedingungen zeigten die elektroeluierten Proteine starke Aggregation.

Tetrahymena rRNA (0,4 µg/ml) wurde mit steigenden Mengen elektroeluiert RNP-Proteine inkubiert. Die Analyse der Protein/RNA-Komplexe erfolgte durch native Gelelektrophorese (siehe Abb.4).

Es wurde eine Proteinkonzentration von 1,4 mg/ml A1 benötigt, um die RNA vollständig zu komplexieren (Abb.4, A.1). Die Verwendung von Proteingemischen reduzierte die benötigte Sättigungskonzentration an Gesamtprotein.

Wurde die RNA mit A1 (0,48 mg/ml) und A2 (0,35 mg/ml) inkubiert, zeigte der resultierende Komplex eine größere Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (Abb.4, B.1); dies ist gleichbedeutend mit einer kleineren Partikelgröße.

Die RNA bildete mit den Core-Proteinen A1 (0,48 mg/ml) und C3 (0,45 mg/ml) zwei unterschiedliche Komplexe aus (siehe Abb.4, C.1). Durch Erhöhung der C3-Konzentration auf 0,9 mg/ml nahm die Konzentration des kleineren Komplexes zugunsten des höhermolekulareren Partikels ab.

Wurden zur Komplexierung der RNA elektroeluierte Coreproteine eingesetzt (A-, B- und C-Proteine), reduzierte sich die Konzentration auf 0,2 mg/ml Proteingemisch (Abb.4, D). Die Wechselwirkung der Coreproteine untereinander scheint für die Bindung an die RNA wichtig zu sein.

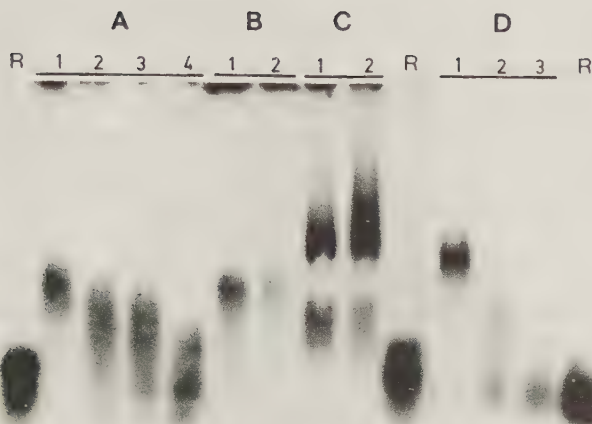


Abb.4 Gelanalyse von in vitro RNA/Protein-Komplexen

(³²P)markierte Tetrahymena RNA (0,4 µg/ml; $1,7 \times 10^6$ cpm/µg RNA) wurde mit den folgenden Proteinen 1 h bei 30°C in Reaktionspuffer inkubiert (siehe Kap.2.6.2).

Nr.	Proteine	Konzentrationen (mg/ml)			
		1.	2.	3.	4.
A	A1	1,4;	0,7;	0,4;	0,2
B	A1+A2	0,48 + 0,35;	0,48 + 0,7		
C	A1+C3	0,48 + 0,45;	0,48 + 0,9		
D	Core	0,2;	0,1;	0,06	

Die Reaktionsansätze wurden auf 5 mM Magnesiumchlorid gebracht, 30 min bei 30°C inkubiert und auf einem 1% Agarosegel/1 x TAE analysiert. Nichtkomplexierte RNA wurde als Größenstandard verwendet (R). Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert (Belichtungszeit: 16 h).

3.3 Milde Nukleasebehandlung A1-gebundender RNA

RNA wird in Gegenwart von Nukleasen schnell abgebaut; selbst die in hnRNP-Partikeln enthaltene RNA ist nicht vor Nukleasen geschützt. Zur Isolierung von RNP-Partikeln aus Zellkernen wird durch eine pH-Wert Erhöhung eine endogene Nuklease aktiviert, die die hnRNA zwischen den RNP-Partikeln verdaut. Dies widerspricht nicht der Annahme, daß die RNP-Proteine hnRNA unter physiologischen Bedingungen schützen. Am Beispiel des Core-Proteins A1 sollte gezeigt werden, ob einzelne RNA-bindende Proteine in der Lage sind, Ribonukleinsäuren vor nukleolytischem Abbau zu schützen.

Die Verdauung von radioaktiv markierter Tetrahymena RNA (545 Basen) mit Micrococcus Nuklease wurde in einer Zeitkinetik verfolgt (Abb.5). Schon nach 5 Minuten ist keine RNA voller Länge mehr detektierbar (A.2); nach 30 Minuten ist die RNA bis auf maximal 150 Nukleotide lange Stücke degradiert (A.4).

Die Gegenwart des Core-Proteins A1 schützt die RNA (B). Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten ist im Reaktionsansatz noch unverdaute RNA zu finden (B.3).

Die offensichtliche RNA-Abnahme im Ansatz B ist nicht durch Micrococcus Nuklease-Behandlung zu erklären:

Für die Verdauungskinetik wurde den Ansätzen nach den angegebenen Zeiten Aliquots entnommen, und die Micrococcus Nuklease durch EGTA-Zugabe gehemmt. Trotz Verwendung silikonisierter Reaktionsgefäße banden die RNA-gebundenen A1-Proteine an die Gefäßwände und waren nicht mehr zu pipettieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Core-Protein A1 in der Lage ist, RNA vor Nukleasen zu schützen. Entweder beruht diese Wirkung auf der Abschirmung der RNA durch die gebundenen A1-Proteine, oder es kommt durch die hohe Proteinkonzentration in der Lösung zu einer verzögerten Nukleasewirkung. Die erste Vermutung ist wahrscheinlicher, da die RNA auch nach längerer Verdauungszeit nicht die typischen Abbauprodukte der Micrococcus Nuklease aufweist.

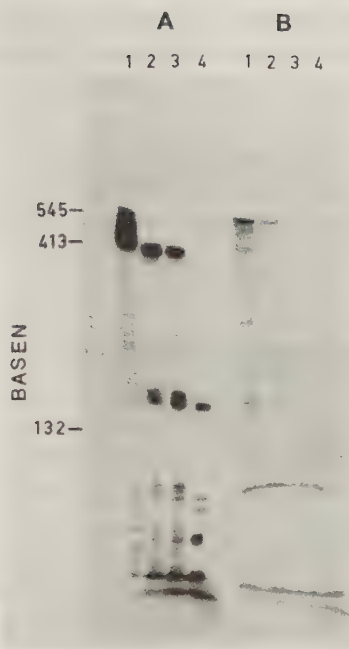


Abb.5

Zeitkinetik der Nukleasebehandlung von RNA, die mit dem Coreprotein A1 komplexiert ist

- A. (^{32}P)markierte *Tetrahymena* RNA ($1 \mu\text{g/ml}$) wurde in 1mM CaCl_2 /STM-A Puffer 30 min bei RT und 10 min bei 37°C inkubiert. Die spezifische Aktivität der RNA betrug $8,5 \times 10^5 \text{ cpm}/\mu\text{g RNA}$. Die milde Nukleasebehandlung erfolgte durch Zugabe von *Micrococcus* Nuklease ($1 \times 10^{-6} \text{ u/ml}$) und Inkubation bei 37°C . Nach 1, 5, 15 und 30 min wurde dem Ansatz je $1/5$ Volumen entnommen und die Verdauung mit 20 mM EGTA gestoppt.
- B. Die unter A. beschriebene Nukleasebehandlung von *Tetrahymena* RNA wurde in Gegenwart des Core-Proteins A1 ($0,8 \text{ mg/ml}$) wiederholt. Nach Stoppen der Verdauung wurden die Proteine mit Proteinase K verdaut ($0,25 \text{ mg/ml}$ Proteinase K, 15 mM EDTA , $0,5\% \text{ SDS}$, $1 \text{ h } 37^\circ\text{C}$).

Die RNAs wurden auf einem denaturierenden 4% Sequenziergel aufgetrennt (Proben 1-4 = 1-30 min Verdauungszeit) und autoradiographiert (Belichtungszeit: 18 h).

Molekulargewichtsmarker: gespleißte *Tetrahymena* RNA

3.4 Spleißen von RNA in Gegenwart von Coreproteinen

Es konnte nachgewiesen werden, daß das Core-Protein C3 ein essentieller Faktor zum Spleißen von hnRNA ist (Choi et al., 1986). Die Art der Beteiligung der anderen RNP-Proteine ist noch weitgehend unbekannt.

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob RNP-Präparationen alle notwendigen Faktoren enthalten, um hnRNA in vitro spleißen können, und ob das Core-Protein A1 das Selbstspleißen der Tetrahymena rRNA beeinflusst.

3.4.1 in vitro Spleißen von β -Globin hnRNA

β -Globin RNA wurde im SP6-System synthetisiert. Sie enthielt ein Intron mit den flankierenden Exons, war mit (^{32}P) markiert und am 5'-Ende mit einer Kappe versehen. Nach der Methode von Choi et al. (1986) wurde die RNA in Gegenwart von Spleißextrakt und ATP in vitro gespleißt. Die zellulären Faktoren, die zum Spleißen von hnRNA benötigt werden, wurden in Form eines Kernextraktes zugesetzt. Dieser Spleißextrakt wurde nach der Methode von Dignam et al. (1983) aus HeLa-S3 Zellen isoliert. Die Proteinanalyse des Extraktes zeigte nicht das typische Proteinmuster von RNP-Proteinen (siehe Abb.1).

Die Spleißansätze wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoffgel analysiert (siehe Abb.6, 1-5). Die Spleißintermediate, die das Intron als Lassostruktur enthalten (Intron - Exon 2), lassen sich leicht durch ihre anomale Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld identifizieren. Sie wandern langsamer als die Vorläufer-RNA (Proben 1, 3 und 4). In Abwesenheit von ATP wird die RNA nicht gespleißt (Proben 2 und 5).

Werden in vitro Spleißansätzen als Proteinkomponente RNP-Komplexe zugesetzt, wird die RNA nicht gespleißt (Abb.6, 6 und 7). Es ist eine geringe Nukleaseaktivität zu bemerken, die bei Verwendung von aufgereinigten 40S Partikeln zunimmt (Proben 8 und 9).

Weder die Proteine des 40S Komplexes, noch das Proteingemisch einer RNP-Präparation sind als Proteinkomponente ausreichend, um RNA in vitro zu spleißen. Der Spleißextrakt enthält Faktoren (u.a. Proteine), die zum Heranreifen von hnRNA notwendig sind und nicht in RNP-Präparationen vorkommen.

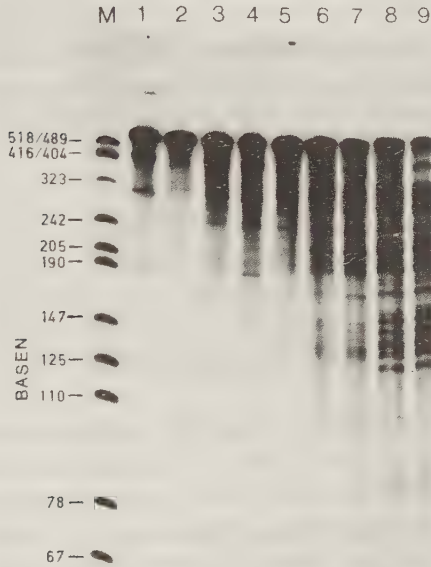


Abb.6

Gelanalyse von in vitro Spleißansätzen

Für in vitro Spleißexperimente wurde im SP6-System (^{32}P)markierte β -Globin RNA synthetisiert, die mit einer 5'-Kappe versehen war und ein Intron mit den flankierenden Exons enthielt (siehe Kap.2.5.1). Die spezifische Aktivität der RNA betrug 8×10^5 cpm/ μg RNA.

Die Spleißreaktionen wurden in 1,5 mM ATP, 5 mM Creatinphosphat, 2 mM MgCl₂ und 20 mM HEPES pH 7,6 durchgeführt und enthielten 6 x 10⁷ cpm/ml unaufgereinigte Vorläufer RNA (Probe 1 und 2) oder 4 x 10⁸ cpm/ml gelaufgereinigte RNA (Proben 3 bis 9; siehe Kap. 2.11.2). Den Spleißansätzen wurden verschiedene Zellkernextrakte aus HeLa-S3 Zellen (je 44% (v/v)) zugesetzt:

Probennr.	Zellkernextrakt
1,2*,3	Spleißextrakt (siehe Kap.2.2.3)
4,5*	nicht zentrifugierter Spleißextrakt (Kap.2.2.3)
6,7*	hnRNP-Kernextrakt (Kap.2.2.1)
8,9*	40S Partikel

* = Kontrollansätze ohne ATP-Zugabe

Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze mit Phenol und Chloroform extrahiert. Die RNAs wurden ethanolgefällt, auf einem 10% Sequenziergel aufgetrennt und 18 h autoradiographiert. Molekulargewichtsmarker: pYPI/YPII / Hpa II

3.4.2 Selbstspleißen von Tetrahymena rRNA

Der Vorläufer der ribosomalen RNA von Tetrahymena spleißt sich selbst. Er entfernt sein Intron ohne Mitwirkung von Proteinen. Der Selbstspleißmechanismus wurde von Zaugg et al. (1983) aufgeklärt, die für die hier vorliegenden Experimente ein T7-Plasmid zur Verfügung stellten, das die Transkription (³²P)markierter rRNA von Tetrahymena ermöglichte.

Nach einstündiger Inkubation eines Standardtranskriptionsansatzes wurde die Spleißreaktion durch 0.2 M NaCl bei 37°C gestartet. Nach 1, 5, 15 und 30 Minuten wurden dem Ansatz Aliquots entnommen und auf einem Sequenziergel analysiert (Abb.7, A1, 1. 1-4). Die Abnahme an Vorläufer rRNA (545 b) und entsprechende Konzentrationszunahme an gespleißter RNA (132 b) ist deutlich zu sehen. Unter den genannten Bedingungen liegt das gespleißte Intron (413 b) bevorzugt in zyklischer Form vor (C IVS).

Wurde die Spleißreaktion mit Natriumchlorid in Gegenwart des Core-Proteins A1 (0,1 mg/ml Protein) gestartet, blieb die Fähigkeit der Tetrahymena rRNA, sich selbst zu spleißen, erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch das Protein A1 nicht beeinflusst (A1, 3. 1-4).

Es bestand die Möglichkeit, daß die Spleißreaktion schneller als die Bindung des Proteins an die synthetisierte RNA ablief, und daß das Protein somit keine Möglichkeit hatte, das Spleißen der RNA zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment bereits dem Transkriptionsansatz 1 mg/ml A1-Protein zugesetzt. Die weitere Versuchsdurchführung entsprach der oben beschriebenen Methode.

Die Autoradiographie der Proben ist in Abb.7, A1,2. 1-4 zu sehen. Die in vitro Transkriptionsrate ist in Anwesenheit des Core-Proteins A1 reduziert; die Spleißreaktion der proteingebundenen RNA ist beschleunigt. Schon nach einer Minute ist die synthetisierte Tetrahymena rRNA vollständig gespleißt. Das Intron liegt zu gleichen Teilen in zyklischer, wie linearer Form vor.

Die Versuchsreihe wurde zur Kontrolle mit Rinderserumalbumin (BSA) wiederholt. Die RNA-Synthese und die Geschwindigkeit der Spleißreaktion war in Gegenwart von BSA herabgesetzt (Abb. 7, BSA, 2); auf die Spleißeffizienz hatte das Protein keinen Einfluß.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Transkription durch hohe Proteinkonzentrationen gehemmt wird; das Selbstspleißen der Tetrahymena rRNA wird durch die Wirkungsweise des Core-Proteins A1 beschleunigt.

Die Elektrophorese gespleißter Tetrahymena rRNA (Probe 2 und 3) auf einem nativen Agarosegel führte zur Auftrennung der RNA in ein Doublett (B/C) mit einer geringeren Wanderungsgeschwindigkeit als Vorläufer rRNA (Probe 1, A). Die Autoradiographie der (^{32}P)-markierten RNAs ist in Abb.8,B. zu sehen.

Die geringste Beweglichkeit im elektrischen Feld zeigte Tetrahymena RNA, die mit A1-Proteinen komplexiert war und anschließend unter Spleißbedingungen inkubiert wurde (Proben 4 und 5; Bande D).

Die der Autoradiographie entsprechenden Bereiche A bis D wurden aus dem Agarosegel ausgestochen, die RNAs wurden isoliert (analog Kap.2.11.1) und auf einem denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoffgel analysiert (siehe Abb.8,A.).

Das RNA-Doublett (B/C) enthält gespleißte und ungespleißte RNA. Die dem Signal B entsprechende RNA enthält einen höheren Anteil an Spleißprodukten, als die RNA des Bereichs C. Dies deutet darauf hin, daß die Spleißprodukte in Abhängigkeit ihrer vorliegenden Konzentration zu einer verminderten Beweglichkeit der gesamten RNA im elektrischen Feld führen (Abb.8.A., B/C).

Der Protein-Komplex mit gespleißter RNA enthält ebenfalls alle Spleißprodukte (D). Das Core-Protein A1 zeigt weder Sequenzspezifität, noch führt es zu einer Trennung der Introns von der reifen RNA.

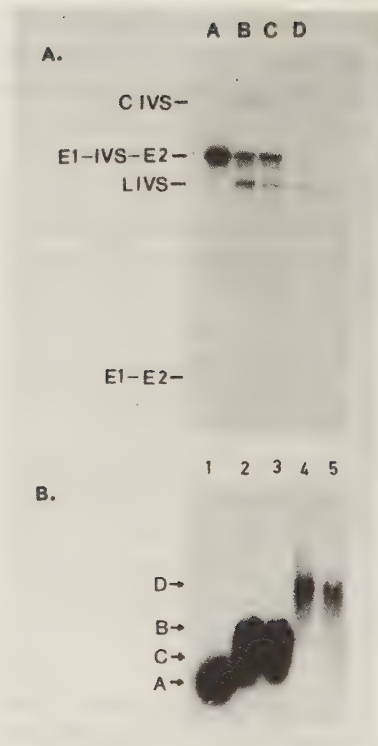


Abb.8

Analyse der gespleißten RNA in RNA/Proteinkomplexen

Neben ungespleißter Tetrahymena rRNA (Spur 1) wurden folgende Proben auf einem nativen Agarosegel elektrophoriert (Kap.2.10.1) und autoradiographiert (Abb.B; Belichtungszeit 72 h bei -70°C) :

Spur	RNA-Proben
2/3	(^{32}P)markierte Tetrahymena rRNA (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde, wie in Kap.2.8.2 beschrieben, gespleißt.
4/5	(^{32}P)markierte Tetrahymena rRNA (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde in Gegenwart von 0,8 mg/ml A1-Protein (analog Kap.2.8.2) gespleißt.

Die den Banden der Autoradiographie entsprechenden Bereiche A (Probe 1), B + C (Proben 2 + 3) und D (Proben 4 + 5) wurden aus dem Gel ausgestochen; die RNA wurde eluiert (analog Kap.2.11.1) und nach Extraktion mit Phenol und Chloroform auf einem 4% Sequenziergel aufgetrennt (Abb.A.).

3.5 Isolierung und Charakterisierung einer A2-cDNA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine A2-spezifische cDNA isoliert und sequenziert werden, um eine vergleichende Analyse der Core-Proteine A1, A2 und C3 durchführen zu können.

Zu diesem Zweck wurde das Protein A2 aus 2D Gelen isoliert und zur Sequenzierung an das Labor von K. Williams, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut geschickt. Dort wurde die Aminosäuresequenz einzelner tryptischer A2-Peptide bestimmt.

Aus den folgenden Peptidsequenzen wurden Oligodesoxyribonukleotide für die Isolierung A2-spezifischer cDNA-Klone abgeleitet:

A2-Peptid N - Y - Y - E - Q - (W) - G - K

DNA-Sequenz 5'-AA^T_C TA^T_C TA^T_C GA^A_G CA^A_G TGG-3'

Oligo 32 3'-TT_G^A AT_G^A AT_G^A CT_C^T GT_C^T ACC-S' (T_M = 44°C)

A2-Peptid G-F-G-D-G-Y-N-G-Y-G-G-G-P-G-G-G-N-F-G-G-S-P-G-Y-G-G-G-R*G-G-Y-G-G-G-G

DNA-Sequenz 5'-GG^ATA^TAA^TGG^ATA^TGG-3'.

$$\text{Oligo 33} \quad 3' \text{--} \underset{\text{C}}{\text{CC}}^{\text{A}} \underset{\text{T}}{\text{AT}}^{\text{A}} \underset{\text{T}}{\text{TT}}^{\text{A}} \underset{\text{C}}{\text{CC}}^{\text{A}} \underset{\text{T}}{\text{AT}}^{\text{A}} \text{CC--}5' \quad (T_M = 48^\circ\text{C})$$

A2-Peptid G-G-Y-G-G-G-G-P-G-Y-G-N-Q-G-G-G-Y-G-G-G-Y-D-N-Y-G-
G-G-N-Y-G-S-G-N-Y-N-D-F-?-N-Y

DNA-Sequenz 5'-GG^A AA^T TA^T AA^T GA^T TT-3'
 C C C C
 T

$$\text{Oligo 34} \quad 3' \text{---} \underset{\text{C}}{\text{CC}}^{\text{A}} \text{TT}^{\text{A}}_{\text{G}} \text{AT}^{\text{A}}_{\text{G}} \text{TT}^{\text{A}}_{\text{G}} \text{CT}^{\text{A}}_{\text{G}} \text{AA-5'} \quad (T_M = 40^\circ\text{C})$$

Die Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Byk Gulden Pharmazeutika, Konstanz als 32er Gemische synthetisiert und (nach Abspaltung der Trityl- und Schutzgruppen) als Lyophilisate geliefert. Sie wurden in Wasser gelöst und ohne weitere Aufreinigung zur radioaktiven Markierung (Kap.2.13.1) und Hybridisierung (Kap.2.14) eingesetzt.

Die Signalintensität bei der Hybridisierung der (^{32}P)markierten Oligodesoxyribonukleotide an A2-spezifische Sequenzen wurde durch zwei Dinge minimiert:

1. maximal jedes 32. Oligodesoxyribonukleotid entsprach der A2-Sequenz,
2. die Ausbeute der 5'-Endmarkierung betrug maximal 20%, d.h. nur jedes fünfte gebundene Oligonukleotid war radioaktiv markiert.

3.5.1 Identifizierung der A2-spezifischen mRNAs

Zur Überprüfung der Oligonukleotid-Sequenzgemische wurde eine Northern-Analyse mit Poly A⁺-RNA aus HeLa S3-Zellen durchgeführt. Wie die Autoradiographie in Abb.9 zeigt, markieren die drei Proben mit unterschiedlicher Intensität eine mRNA von 2 kb Länge und zwei kleinere mRNAs (1,2/0,9 kb).

Bei der Erhöhung der Waschtemperatur von 38°C auf 42°C verschwanden die Signale bei 0,9 und 1,2 kb. Dies deutet auf eine Kreuzhybridisierung der degenerierten Proben mit den vorher detektierten RNA Spezies hin. Die Bande bei 2 kb blieb auch unter den stringenten Bedingungen erhalten.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Northern-Analyse mit einer A2-spezifischen cDNA wiederholt. Die Autoradiographie zeigt nur ein Signal bei 2 kb (Abb.9, Spur 2). Im Gegensatz zu den mRNAs der Proteine A1 und C3 scheint bei der A2-spezifischen mRNA keine zweite Polyadenylierungsstelle benutzt zu werden.

Die Länge der A2-spezifischen mRNA korreliert gut mit der gelelektrophoretisch ermittelten A2-Proteingröße von 32-39 kd, die eine mRNA-Länge von mindestens 1,4 kb erwarten läßt.

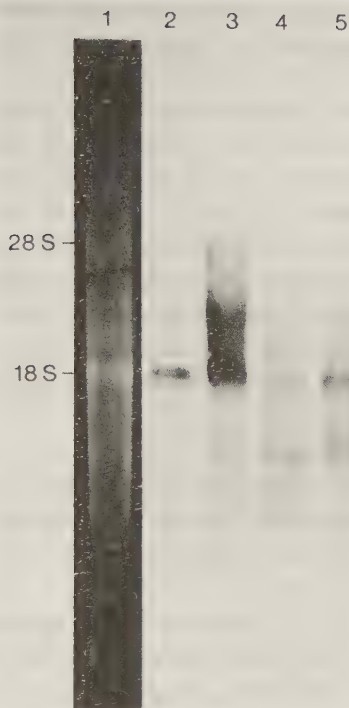


Abb.9

Northern-Analyse zur Expression A2-spezifischer mRNA in HeLa Zellen
Cytoplasmatische, polyadenylierte RNA aus HeLa-S3 Zellen (5 µg/Spur)
wurde auf einem 1% Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt (Kap.2.10.2).

1. ethidiumbromidgefärbte HeLa-RNA mit internen Molekulargewichtsmarkern 28S und 18S

Die RNA wurde auf Nylonmembran transferiert (Kap.2.12.1) und mit unterschiedlichen Proben hybridisiert (Kap.2.14) :

	(³² P)markierte Hybridisierungsprobe	T _{Hybr.}	Belicht.-zeit
2.	A2-cDNA aus λgt10-2.1 (670 bp)	65°C	4 h
3.	Oligonukleotid 32	38°C	72 h
4.	Oligonukleotid 33	38°C	72 h
5.	Oligonukleotid 34	38°C	72 h

Die Membranen wurden anschließend 3 x 10 min mit 1 x SSC/ 0,1% SDS (Probe 2) bzw. 6 x SSC/ 0,1% SDS (Proben 3-5) bei der angegebenen Hybridisierungstemperatur gewaschen und autoradiographiert.

3.5.2 Isolierung und Charakterisierung A2-spezifischer λ -Phagen aus cDNA-Banken

Da die Core-Proteine A1 und A2 sehr homolog sind, wurde die relative Lage der A2-Peptide durch Vergleich mit A1-Sequenzen bestimmt. Demnach müßte das Oligonukleotid 32 im 5'-Bereich der A2-Sequenz hybridisieren.

Die A2-Peptide, von denen die Oligonukleotide 33 und 34 abgeleitet wurden, zeigen starke Homologie zu einer inserierten A1-Sequenz, die von te Heesen (1986) gefunden wurde. Da diese Peptide außerdem eine Überlappung von 7 Aminosäuren aufweisen, sollten beide Oligonukleotide (33 und 34) im 3'-Bereich der A2-Sequenz hybridisieren.

Das Sequenzgemisch der Oligodesoxyribonukleotide 33 wurde nicht zu Isolierung A2-spezifischer λ -Phagen eingesetzt, da es in der Northern-Analyse nur schwach hybridisierte.

Die Hybridisierung der (32 P)markierten Sequenzgemische 32 und 34 an $1,5 \times 10^5$ Rekombinante einer HeLa cDNA-Bank führte zur Isolierung eines A2-spezifischen λ gt11-Phagens (Klon 6.2). Die Charakterisierung der cDNA (600 bp) zeigte, daß sie für den N-terminalen Bereich des A2-Proteins kodiert (siehe Abb.10 und 11).

Die cDNA wurde isoliert, radioaktiv markiert und gegen eine andere HeLa cDNA-Bank hybridisiert (λ gt10; 2×10^5 Rekombinante). Es wurden drei λ -Phagen isoliert (1.13, 1.17 und 2.1), die in ihrem Restriktionsmuster mit der cDNA des λ gt11-Phagens 6.2 übereinstimmten (Abb.10, A, Spuren 3-8). Wie zu erwarten, hybridisierten sie mit dem Oligonukleotidgemisch 32 (Abb.10, B, Spuren 3-8). Obwohl die cDNA des λ gt10-Phagens 1.17 mit einer Länge von 1,3 kb den gesamten kodierenden Bereich des A2-Proteins abdecken sollte, verlief die Hybridisierung des Oligonukleotidgemisches 34 an die restringierte cDNA 1.17 negativ (siehe Abb.10, Spur 5 und 6). Die spätere Sequenzierung der DNA wies auf ein Klonierungsartefakt hin; 800 Nukleotide des 3'-Bereichs zeigten keine Ähnlichkeiten mit Sequenzen, die für das Protein A2 kodierten.

In einem weiteren Versuch, einen cDNA-Klon zu isolieren, der die gesamte kodierende Region für das A2-Protein enthält, wurde die cDNA des λ gt10-Phagens 1.13 gegen je $1,5 \times 10^5$ Rekombinante der λ gt10 und λ gt11 HeLa cDNA-Bibliotheken hybridisiert.

Von den 4 positiven Phagen C3, C10.700, C9 und HW 3 hybridisierten die restringierten cDNAs der λ gt11Klone C10.700 (750 bp) und C9 (1,4 kb) mit dem Sequenzgemisch des Oligonukleotids 34 (Abb.10, B, Spuren 11-16). Dies deutete darauf hin, daß sie den 3'-kodierenden Bereich für das A2 Protein enthalten.

Das Oligodesoxyribonukleotid 33 hybridisierte nicht an die DNA; die spätere Sequenzierung (Kap.3.5.3) zeigte, daß das Oligonukleotidgemisch 33 fehlerhaft synthetisiert wurde.

Nach der Southern-Analyse aller A2-spezifischen cDNAs mit den Oligonukleotidgemischen 32 und 34 (Abb.10) wurden die Restriktionskarten erstellt (Abb.11). Die cDNA-Klone decken den für das Protein A2 kodierenden Bereich ab.



Abb.10

Southern-Analysen A2-spezifischer λ -Phagen mit Oligonukleotiden

Die cDNA der potentiellen A2-Klone wurde isoliert (Kap.2.16.2), re-stringiert (siehe Tabelle) und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

M : Molekulargewichtsmarker

M₁ : λ sam 7 mit Eco RI und Hind III restringiert

M₂ : λ sam 7 mit Hind III restringiert

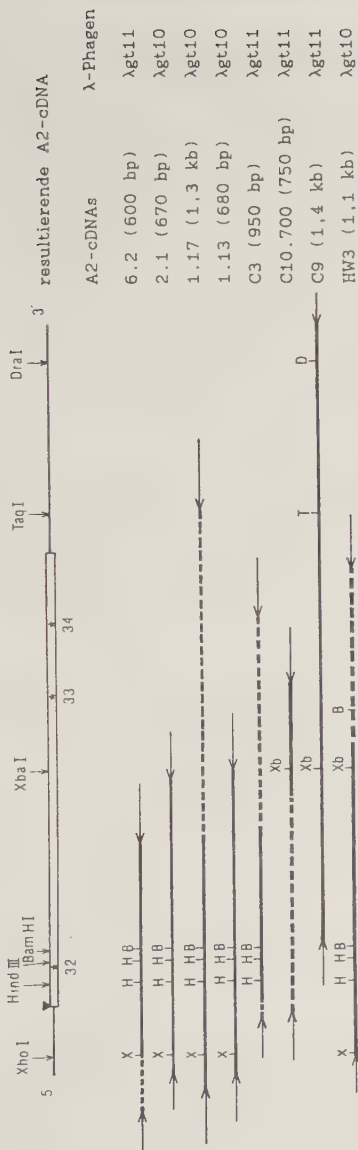
λ -Phagen	Nr.	Restriktion	Nr.	Restriktion	Nr.	Restriktion
6.2	1	EcoRI/SstI	2	EcoRI/BamHI		
2.1	3	Eco RI	4	EcoRI/BamHI		
1.17	5	Eco RI	6	EcoRI/BamHI		
1.13	7	Eco RI	8	EcoRI/BamHI		
C3	9	Eco RI	10	EcoRI/BamHI		
C10.700	11	Eco RI	12	EcoRI/BamHI	13	EcoRI/XbaI
C9	14	Eco RI	15	EcoRI/BamHI	16	EcoRI/XbaI
HW3	17	Eco RI	18	EcoRI/BamHI	19	EcoRI/XbaI

A. ethidiumbromidgefärbtes 1% Agarosegel der restringierten, elektrophorierten A2-cDNAs oben genannter λ -Phagen

Nach der Methode von Southern (Kap.2.12.2) wurde die denaturierte DNA auf Nylonmembran transferiert und mit (³²P)markierten DNA-Oligodesoxyribonukleotiden hybridisiert (Kap.2.14):

- B. Hybridisierung mit Oligonukleotidgemisch 32 bei 40°C;
Waschbedingungen: 6 x SSC/ 0,1% SDS; 40°C; 3 x 10 min;
Autoradiographie nach 40 h Belichtungszeit
- C. Hybridisierung mit Oligonukleotidgemisch 34 bei 37°C;
Waschbedingungen: 6 x SSC/ 0,1% SDS; 37°C; 3 x 10 min;
Autoradiographie nach 45 h Belichtungszeit

Abb. 11 Restriktionskarten der A2-spezifischen cDNAs



• = Bindungsstellen der Oligodesoxyribonukleotide 32, 33, 34

▭ = kodierender Bereich

▼ = erstes Methionin

→;← = flankierende Vektor-DNA

----- = A2-fremde Sequenz

3.5.3 Sequenzierung der A2-homologen cDNAs

Die cDNAs der A2-spezifischen λ -Phagen wurden mit den Enzymen, die in Abb. 11 angegeben sind, restringiert und in M13-Vektoren subkloniert. Es wurde darauf geachtet, daß die umklonierten A2-spezifischen cDNA-Fragmente überlappen, und daß die Fragmentlänge 600 bp nicht übersteigt. Die anschließende Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

Die cDNA des λ gt10-Phagens HW3 wurde nicht sequenziert, da die Restriktionskarte auf eine A2-fremde Sequenz im 3'-Bereich hinwies. Die Bestimmung der Sequenz, die für das A2-Protein kodiert, wurde dadurch erschwert, daß über 50% der isolierten cDNAs A2-fremde Sequenzabschnitte enthielten. Diese Klonierungsartefakte wurden in beiden HeLa cDNA-Banken gefunden.

Eine der folgenden Kriterien mußte die resultierende cDNA-Sequenz, die für das Protein A2 kodiert, erfüllen:

Entweder war die DNA-Sequenz in mehreren Klonen identisch, oder sie kodierte für A2-Peptide, deren Aminosäuresequenzen von K. Williams bestimmt worden war.

Der Sequenzvergleich der einzelnen cDNAs ist in Abb.12 wiedergegeben unter Angabe der resultierenden A2 cDNA- und Proteinsequenzen.

Das Startkodon des A2-Proteins wurde mit Hilfe einer Konsensussequenz identifiziert, die für die Initiation der Translation gefunden wurde (Koziak, 1987).

Konsensussequenz:	5'-GCC ^A CCAUGG-3'
A2 cDNA-Sequenz :	5'-TCCGCGATGG-3'

Die A2-spezifische cDNA (1,7 kb) enthält 153 bp 5'-nichttranslatierten Bereich und 515 bp 3'-nichttranslatierten Bereich, in dem sich ein Polyadenylierungssignal befindet (AATAAA). Das abgeleitete A2-Protein hat eine Länge von 341 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 36 kd entspricht.

6.2 TCGATTCCXTGGGTGGTGGTATGGCCXXTXXTAGTTGGTGGAGCTATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTC

6.2 TGGCATGCTAACTAGTTACGCGACCCCCGAGGAGGTGTXTCTCGAGCAGCGGCACTTCTCACTACAGCGCCAGGACGAG
 2.1/1.13 C-GCCCGTGGCG-G-T-CT--T--CA---T---T-----
 A2 CGGCCCGTGGCGAGGTGTCTCTCGAGAGTTGTTTCTCGAGCAGCGGCACTTCTCACTACAGCGCCAGGACGAG

6.2 TCCGGTTCGTGTTCTGCTCCGCGGAGATCTCTCATCTCGCTCGGCTGCGGAAATCGGGCTGAAGCGACTGAGTCCGCG
 2.1/1.13 -----
 C3 --X--C-TTA-AACT-TTC--TT-GAGAG-
 C10.700 AT-CCG-A-ATACTC-G-AGA
 A2 TCCGGTTCGTGTTCTGCTCCGCGGAGATCTCTCATCTCGCTCGGCTGCGGAAATCGGGCTGAAGCGACTGAGTCCGCG

1 Hind III 60
 6.2 ATG GAG AGA GAA AAG GAA CAG TTC CGT AAG CTC TTT ATT GGT GGC TTA AGC TTT GAA ACC
 2.1/1.13 ---
 C3 -AA X--
 C10.700 GCT TCA GCT -G- -T- -TC GT- GAT TCA C-- A-A AAG TAG ATC -A- -A- -A- -GG C-G -AA
 A2 ATG GAG AGA GAA AAG GAA CAG TTC CGT AAG CTC TTT ATT GGT GGC TTA AGC TTT GAA ACC
 p.A2 M E R E K E Q F R K L F I G G L S F E T

Hind III 120
 6.2 ACA GAA GAA AGT TTG AGG AAC TAC TAC GAA CAA TGG GGA AAG CTT ACA GAC TAT GTG GTA
 2.1/1.13 ---
 C3 -T- -G-
 C10.700 TTG TG- AGC --G -GA TA- --G AG- A-A CC- -GT CCC ACG --T -CC -AT A-T G-C AGC T-C
 A2 ACA GAA GAA AGT TTG AGG AAC TAC TAC GAA CAA TGG GGA AAG CTT ACA GAC TAT GTG GTA
 p.A2 T E E S L R N Y Y E Q W G K L T D Y V V
 OLIGO 32

Bam HI 180
 6.2/2.1 ATG AGG GAT CCT GCA AGC AAA AGA TCA AGA GGA TTT GGT TTT GTA ACT TTT TCA TCC ATG
 1.13/C3 ---
 C9 -C-
 C10.700 -GA CTT TG- TT- TTT -A- --T TTG AA- -AT TAT -C- TTA A-G TAT -AA G-A ATT -TA TGT
 4.2 ---
 A2 ATG AGG GAT CCT GCA AGC AAA AGA TCA AGA GGA TTT GGT TTT GTA ACT TTT TCA TCC ATG
 p.A2 M R D P A S K R S R G F G F V T F S S M

240
 6.2 GCT GAG GTT GAT GCT GCC ATG GCT GCA AGA CCT CAT TCA ATT GAT GGG AGA GTA GTT GAG
 2.1/1.13 ---
 C9/C3 ---
 C10.700 AAA TTA A-A A-- CA- AAT T-C AT- T-C -C- TTG AT- AA- GC- -C- -TA TAG A-T TAG -GT
 4.2 ---
 A2 GCT GAG GTT GAT GCT GCC ATG GCT GCA AGA CCT CAT TCA ATT GAT GGG AGA GTA GTT GAG
 p.A2 A E V D A A M A A R P H S I D G R V V E

300

6.2 CCA AAA CGT GCT GTA GCA AGA GAG GAA TCT GGA AAA CCA GGG GCT CAT GTX ACT GTG AAG
 2.1 ----
 1.13/C9/C3 ---- --A ----
 C10.700 G-- GG- -T- AA- AAT AGT -T- -TT ATT GT- T-T TTT TA- -AA AAG -TC AGT T-- AGA G-C
 4.2 ----

A2 CCA AAA CGT GCT GTA GCA AGA GAG GAA TCT GGA AAA CCA GGG GCT CAT GTA ACT GTG AAG
 P .A2 P K R A V A R E E S G K P G A H V T V K

360

6.2 AAG CTG TTT GTT GGC GGA ATT AAA GAA GAT ACT GAG GAA CAT CAC CTT AGA GAT TAC TTT
 2.1/1.13 ----
 C9/C3 ----
 C10.700 -TA --A --A C-- TAG -AC TG- GT- -TT -TA TA- TT- T-- G-- G-- AGA T-- TGC -GT CAA
 4.2 ----

A2 AAG CTG TTT GTT GGC GGA ATT AAA GAA GAT ACT GAG GAA CAT CAC CTT AGA GAT TAC TTT
 P .A2 K L F V G G I K E D T E E H H L R D Y F

420

6.2 GAG
 2.1 --- GAA TAT GGA AAA ATT GAT ACC ATT GAG ATA ATT ACT GAT AGG CAG XCT GGA AAG AAA
 1.13/C9 ---- --T-- ----
 C3 ---- --A ATG -TX TTX GAA ATT -TA -CC
 C10.700 -CA AT- -TG TTT T-T T-G T-A TAA -A- ATA CA- -AA T-A CT- GCC AGC AG- A-- --A -GG
 4.2 ---- -CA CCT GA- CCC CA- --C T-T ATC T-- CTG -TC C-C

A2 GAG GAA TAT GGA AAA ATT GAT ACC ATT GAG ATA ATT ACT GAT AGG CAG TCT GGA AAG AAA
 P .A2 E E Y G K I D T I E I I T D R Q S G K K

480

2.1 AGA GGC TTT GGC TTT GTA ACT TTT GAT GAC CAT GAT CCT GTG GAT AAA TCG GTA TTG CAG
 1.13 ---- --T-- ----
 C9 ---- --T-- ----
 C3 --C AA- C-- CTA AC- ACG GTC CAA TGA AGA GTG --A A-- T-G -TG GT- G-A -G-
 C10.700 -CC -A- -A- AC- GAC C-T T-- GA- T-G T-A ACA -TA GAA TCA A-A ----
 4.2 CTG CTA --C AC- CCA T-T C-C -G- AT- TC- TTC TT- --- A-T CC- C-C C-T -AT CAC GCT

A2 AGA GGC TTT GGC TTT GTT ACT TTT GAT GAC CAT GAT CCT GTG GAT AAA TCG GTA TTG CAG
 P .A2 R G F G F V T F D D H D P V D K S V L Q

Xba I 540

2.1 AAA TAC CAT ACC ATC AAT GGT CAT AAT GCA GAX GTA
 1.13 ---- --A-- AGA AAA GCT TTG CCG
 C9 ---- --A-- ---- T-T AGA CAA GAA
 C10.700 ---- --A-- ---- --G-- T-T ----
 4.2 TG- -TT AT- GAT GG- -G- TCC ACC -GG C-T A-T CGC CAC -T- C-A GCA AAT GC-

A2 AAA TAC CAT ACC ATC AAT GGT CAT AAT GCA GAA GTA AGA AAA GCT TTG TCT AGA CAA GAA
 P .A2 K Y H T I N G H N A E V R K A L S R Q E

C9 600
C10.700 ATG CAG GAA GTT CAG AGT TCT AGG AGT GGA AGA GGA GGC AAC TTT GGC TTT GGG GAT TCA

A2
p.A2 ATG CAG GAA GTT CAG AGT TCT AGG AGT GGA AGA GGA GGC AAC TTT GGC TTT GGG GAT TCA
M Q E V Q S S R S G R G G N F G F G D S

C9 660
C10.700 CGT GGT GGC GGT GGA AAT TTC GGA CCA GGA CCA GGA AGT AAC TTT AGA GGA GGA TCT GAT

A2
p.A2 CGT GGT GGC GGT GGA AAT TTC GGA CCA GGA CCA GGA AGT AAC TTT AGA GGA GGA TCT GAT
R G G G G N F G P G P G S N F R G G S D

C9 720
C10.700 GGA TAT GGC AGT GGA CGT GGA TTT GGG GAT GGC TAT AAT GGG TAT GGA GGA GGA CCT GGA

A2
p.A2 GGA TAT GGC AGT GGA CGT GGA TTT GGG GAT GGC TAT AAT GGG TAT GGA GGA GGA CCT GGA
G Y G S G R G F G D G Y N G Y G G G P G
OLIGO 33

C9 780
C10.700 GGT GGC AAT TTT GGA GGT AGC CCC GGT TAT GGA GGA GGA AGA GGA GGA TAT GGT GGT GGA
--- --- CG
A2
p.A2 GGT GGC AAT TTT GGA GGT AGC CCC GGT TAT GGA GGA GGA AGA GGA GGA TAT GGT GGT GGA
G G N F G G S P G Y G G G R* G G Y G G G

C9:A2 840
p.A2 GGA CCT GGA TAT GGC AAC CAG GGT GGG GGC TAC GGA GGT GGT TAT GAC AAC TAT GGA GGA
G P G Y G N Q G G G Y G G G Y D N Y G G

C9:A2 900
p.A2 GGA AAT TAT GGA AGT GGA AAT TAC AAT GAT TTT GGA AAT TAT AAC CAG CAA TCT TCT AAC
G N Y G S G N Y N D F G N Y N Q Q P S N
OLIGO 34

C9:A2 960
p.A2 TAC GGT CCA ATG AAG AGT GGA AAC TTT GGT GGT AGC AGG AAC ATG GGG GGA CCA TAT GGT
Y G P M K S G N F G G S R N M G G P Y G

C9:A2 1020
p.A2 GGA GGA AAC TAT GGT CCA GGA GGC AGT GGA GGA AGT GGG GGT TAT GGT GGG AGG AGC CGA
G G N Y G P G G S G G S G G Y G G R S R

C9:A2
p.A2 TAC TGA GCTTCTCTATTTGCCATGGGCTTCACTGTATAAATAGGAGAGGATAGAGCCAGAGGTAACAGAACGC
Y stop

C9:A2
p.A2 ^{TaqI}
TTCAGGTTATCGAAATAACCAATGTTAAGGAAACTCTTATCTCAGTCATGCATAAATATGCAGTGATATGGCAGAAGAC
C9:A2 ACCAGAGCAGATGCAGAGAGCCATTTTGTGAATGGATTATTTAATAACATTACCTTACTGTGGAGGAAGGATTG
C9:A2 TAAAAAAAATGCCTTTGAGACAGTTCTTAGCTTTTAATTGTTGTTCTTCTAGTGGTCTTTGTAAGAGTGTAGAA
C9:A2 GCATTCCTTCTTTGATAATGTTAAATTTGTAAGTTTCAGGTGACATGTGAACCTTTTTTAAGATTTTCTCAAGTTT
C9:A2 TGAAAGCTATTAGCCAGGATCATGGTGTAAATGAACATAACGTTTTTCCCTTTAAAAAAATTTAAGTGCGTGTGTAGAG
C9:A2 TTAAGAAGCTGTGTACATTTATGATTTAATAAAATAATTCTAAAGGCG Dra I

Erläuterungen zu Abbildung 12:

Die Sequenzen der einzelnen cDNAs wurden unter Angabe ihrer Bezeichnung und der resultierenden A2. cDNA- (A2) und Proteinsequenz (p. A2) verglichen. Gleiche Nukleotide sind (bezogen auf die erste Sequenz) als Strich dargestellt [---]. Der 3'-Bereich der A2-cDNA wurde nur von der DNA des Klons C9 abgedeckt. In diesem Fall ist die resultierende A2-Sequenz mit der cDNA des Klons C9 identisch (C9: A2). Die Erkennungssequenzen einzelner Restriktionsenzyme und die Hybridisierungsstellen der Oligodesoxyribonukleotide sind markiert.

R* = Dimethylarginin (siehe Kap.3.5; A2-Peptidsequenzen)

Die prozentuale Aminosäurezusammensetzung des abgeleiteten A2-Proteins (1) stimmt in guter Näherung mit den Werten überein, die H. Werr (1984) durch Hydrolyse des A2-Proteins (2) ermittelt hat:

Aminosäure	Aminosäurezusammensetzung in Molprozent	
	1	2
A	3,2	4,2
R	7,0	6,7 + 0,1*
N	5,6	10,5
D	5,0	
C	-	0,3
Q	2,9	9,7
E	5,9	
G	25,2	24,7
H	2,1	1,8
I	2,3	2,7
L	2,1	3,0
K	4,7	4,5
M	2,1	1,7
F	5,9	5,4
P	4,1	4,0
S	7,6	6,8
T	2,9	3,1
W	0,3	-
Y	6,7	6,1
V	4,4	4,7

* Die Hydrolyseprodukte des Coreproteins A2 enthielten 0,1 Molprozent der asymmetrischen Aminosäure N^G,N^G Dimethylarginin, die auch bei der Sequenzierung der tryptischen A2-Peptide detektiert wurde (siehe Abb.12, R*).

3.6 Nachweis A2-spezifischer DNA-Sequenzen in genomischer HeLa-DNA

Zur Analyse, ob A2-spezifische Gene intronhaltig oder intronlos sind, wurde eine Southern-Analyse mit restringierter, genomischer HeLa-DNA durchgeführt (Kap.2.14). Als Hybridisierungsprobe wurde die cDNA des λ -Phagen C9 eingesetzt (siehe Abb.11). Sie hat eine Länge von 1,35 kb und entspricht dem A2-spezifischen cDNA-Fragment, das durch Restriktion mit den Endonukleasen Bam HI und Dra I entsteht. Diese Probe wurde gegen genomische DNA hybridisiert, die mit diesen Restriktionsenzymen verdaut wurde. Die Autoradiographie ist in Abb.13 zu sehen.

Die unspezifische Bindung der (32 P)markierten Probe an die genomische DNA konnte nicht durch stringentes Waschen der Membran aufgehoben werden.

Die genomische DNA, die mit den Endonukleasen Bam HI und Dra I restringiert wurde, enthält minimal zwei Fragmente, die mit der cDNA hybridisieren (Abb.13, 2'). Das Signal bei 1,3 kb läßt auf die Existenz intronloser A2-Gene schließen, da die Länge des genomischen Fragments mit der Größe des eingesetzten cDNA-Fragments übereinstimmt.

Das Signal bei 750 bp entspricht einem genomischen DNA-Fragment, das durch Restriktion mit der Endonuklease Dra I entstanden ist (vergleiche 2', 3'). Die Hybridisierung der cDNA mit diesem Fragment deutet auf ein zweites A2-Gen hin, dessen verändertes Restriktionsmuster durch Introns zu erklären ist. Diese Vermutung wird durch die cDNA-Hybridisierung an weitere Dra I-Fragment der Länge 1,15 kb und 2,4 kb unterstützt.

Obwohl die unspezifische Hybridisierung der Probe die Detektion höhermolekularer, A2-spezifischer Fragmente unterbindet, deutet die Southern-Analyse auf zwei Klassen von A2-Genen hin: A2-Gene, die Introns enthalten und intronlose Gene, die für das Coreprotein A2 kodieren.

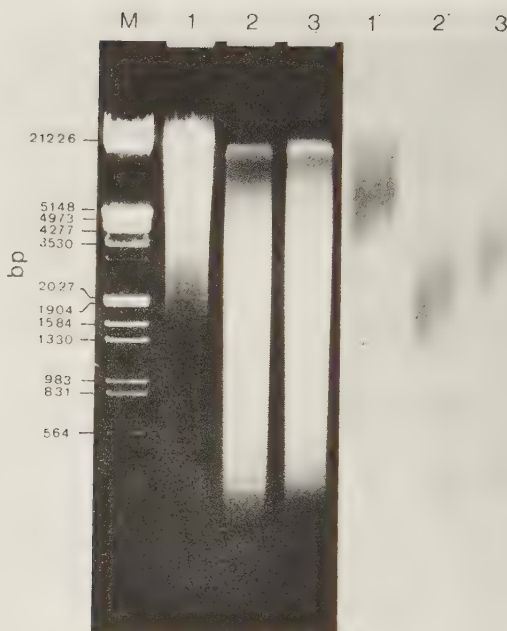


Abb.13

Nachweis A2-spezifischer Restriktionsfragmente in genomischer HeLa-DNA

Hochmolekulare, genomische DNA wurde aus HeLa-S3 Zellen isoliert (Kap.2.9.2) und je 10 µg DNA restringiert:

1. Restriktion mit Bam HI
2. Restriktion mit Bam HI und Dra I
3. Restriktion mit Dra I

Die restringierte DNA wurde auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt (Kap.2.10.1). Als Molekulargewichtsmarker wurde λ sam 7/Eco RI, Hind III elektrophoriert.

Die DNA wurde denaturiert, auf Nylonmembran transferiert (Kap. 2.12.2) und mit (³²P)markierter A2-cDNA des λ-Phagens C9 hybridisiert (Kap.2.14). Die Hybridisierung wurde in 50% Formamid durchgeführt bei einer spezifischen Aktivität der Lösung von 1 × 10⁶ cpm einzelsträngiger cDNA/ml (spez. Aktivität der (³²P)markierten DNA: 1 × 10⁶ cpm/µg DNA). Die Membran wurde in 1 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen und anschließend 48 h autoradiographiert (1' - 3').

3.7 Vergleich der Core-Proteine A1, A2 und C3

3.7.1 cDNA- und Protein-Sequenzvergleich der basischen Core-proteine A1 und A2

Die bisher zur Verfügung stehenden Daten weisen auf eine starke Homologie der basischen RNP-Proteine A1 und A2 hin. Der Differenzindex (DI), der den Verwandtschaftsgrad zweier Proteine angibt, kann Werte von 0 (für identische Proteine) bis 100 (für Proteine mit gänzlich verschiedener Aminosäurezusammensetzung) annehmen (Metzger et al., 1968). Für die Proteine A1 und A2 beträgt er 8,6.

Werden die Differenzindices der Proteine A1 und A2 mit dem sauren RNP-Protein C3 verglichen, zeigen die Werte einen signifikant geringeren Verwandtschaftsgrad an:

$$DI (A1-C3) = 20,2$$

$$DI (A2-C3) = 25,6$$

$$DI (A1-A2) = 8,6$$

Die große Homologie der A1- und A2-Proteine bestätigt sich durch den Vergleich ihrer cDNA- und Proteinsequenzen (Abb.14).

S.te Heesen isolierte und charakterisierte 1986 eine A1-spezifische cDNA, die eine Insertion von 156 bp aufweist. Die insertierte Sequenz wurde in Abb.14 an entsprechender Stelle der A1-Sequenz angegeben (A1*), da sie ebenfalls große Homologie zur A2-Sequenz aufweist.

Die N-terminalen Bereiche der abgeleiteten Proteinsequenzen (AS : 1-181/A2; AS : 6-187/A1) weisen 78,5% Sequenzhomologie auf. Die entsprechenden cDNA-Sequenzen sind nur zu 71,6% homolog, da in vielen Fällen die gleichen Aminosäuren durch andere Tripletts kodiert sind. Die C-terminalen Bereiche sind in zueinander verschobenen Sequenzabschnitten homolog (dies schließt die inserierte Sequenz (A1*) mit ein). Die 5'- und 3'-nichttranslatierten Bereiche der A1- und A2-cDNAs sind sehr verschieden.

Abb.14

Sequenzvergleich von A1 und A2

A2 CGGCCCGTGGGAGGTGCTCTCGCAGAGTTGTTTCTGAGCAGCGGCAGTTCTCACTA

A1(α) GTCTCTCTTCCACCTGCGCTC

A2 CAGCGCCAGGACGAGTCCGGTTCGTGTTCTGTCGGGAGATCTCTCTCATCTCGCTCG-CTG-GGGAA-T-GG--T-AA

A1(α) ATG TCT AAG TCA GAG TCT CCT AAA GAG CCC GAA CAG CTG AGG AAG CTC TTC ATT GGA GGG

A2 GC- A-- G-- --C -C- ATG GAG -G- --A AAG --- --T -C C-T --- --T --- --T --C

p.A1 M S K S E S P K E P E Q L R K L F I G G

p.A2 M E R - K - - F - - - - - - -

A1(α) TTG AGC TTT GAA ACA ACT GAT GAG AGC CTG AGG AGC CAT TTT GAG CAA TGG GGA ACG CTC

A2 --A --- --C --A --A --A --T T-- --- -A- T-C -AC --A --- --A --T

p.A1 L S F E T T D E S L R S H F E Q W G T L

p.A2 - - - - - E - - - - N Y Y - - - - K -

A1(α) ACG GAC TGT GTG GTA ATG AGA GAT CCA AAC ACC AAG CGC TCC AGG GGC TTT GGG TTT GTC

A2 --A --- -A- --- --G --- --T GCA -G- --A A-A --A --A --A --- --T --- --A

p.A1 T D C V V M R D P N T K R S R G F G F V

p.A2 - - Y - - - - A S - - - - - - - -

A1(α) ACA TAT GCC ACT GTG GAG GAG GTG GAT GCA GCT ATG AAT GCA AGG CCA CAC AAG GTG GAT

A2 --T -T- T-A T-C A-- -CT --- --T --- --T --C --- GC- --- --A --T --T TCA A-T ---

p.A1 T Y A T V E E V D A A M N A R P H K V D

p.A2 - F S S M A - - - - A - - - - S I -

A1(α) GGA AGA GTT GTG GAA CCA AAG AGA GCT GTC TCC AGA GAA GAT TCT CAA AGA CCA GGT GCC

A2 --G --- --A --T --G --- --A C-T --- --A G-A --- --G --A --- GG- -A- --- --G --T

p.A1 G R V V E P K R A V S R E D S Q R P G A

p.A2 - - - - - - - - A - - E - G K - - -

A1(α) CAC TTA ACT GTG AAA AAG ATA TTT GTT GGT GGC ATT AAA GAA GAC ACT GAA GAA CAT CAC

A2 --T G-- --- --G --- C-G --- --C --A --- --T --- --G --- --G ---

p.A1 H L T V K K I F V G G I K E D T E E H H

p.A2 - V - - - L - - - - - - - - - - -

A1(α) CTA AGA GAT TAT TTT GAA CAG TAT GGA AAA ATT GAA GTG ATT GAA ATC ATG ACT GAC CGA
A2 --T --- --- --C --- --G G-A --- --- --- --T ACC --- --G --A --T --- --T A-G
p.A1 L R D Y F E Q Y G K I E V I E I M T D R
p.A2 - - - - - E - - - - D T - - - I - - -

A1(α) GGC AGT GGC AAG AAA AGG GGC TTT GCC TTT GTA ACC TTT GAC GAC CAT GAC TCC GTG GAT
A2 CAG TC- --A --- --- --A --- --- --G- --- --T --T --- --T --- --- --T C-T --- ---
p.A1 G S G K K R G F A F V T F D D H D S V D
p.A2 Q - - - - - - - G - - - - - - - P - -

A1(α) AAG ACT GTC ATT CAG AAA TAC CAT ACT GTG AAT GGC CAC AAC TGT GAA GTT AGA AAA GCC
A2 --A T-G --A T-G --- --- --- --C A-C --- --T --T --T GCA --A --A --- --- --T
p.A1 K I V I Q K Y H T V N G H N C E V R K A
p.A2 - S - L - - - - - I - - - - A - - - - -

A1(α) CTG TCA AAG CAA GAG ATG GCT AGT GCT TCA TCC AGC CAA AGA GGT CGA AGT GGT TCT GGA
A2 T-- --T -GA --- --A --- CAG GAA -T- CAG AGT TCT --G A-- G-- --A --A --C
p.A1 L S K Q E M A S A S S S Q R G R S G S G
p.A2 - - R - - - Q E V Q - - - S G R - -

A1(α) AAC TTT GGT GGT GGT CGT GGA GGT GGT TTC GGT GGG AAT GAC AAC TTC GGT CGT GGA GGA
A2 --- --- --C TT- --G GA- TC- C-- --- GG- --- --A --- TT- GGA CCA --A -CA --- A-T
p.A1 N F G G G R G G G F G G N D N F G R G G
p.A2 - - - F - D S R - G - - - F G P - P - S

A1(α) AAC TTC AGT GGT CGT GGT GGC TTT GGT GGC AGC CGT GGT GGT GGA TAT GGT GGC AGT
A2 --- --T --A --A G-A TC- -AT GGA TA- --- --T G-A C-- --A TT-
p.A1 N F S G R G G F G G S R G G G G Y G G S
p.A2 - - R - G S D G Y - - G R - F

*

A1(α)/ A1* GGG GAT GGC TAT AAT GGA TTT GGT AAT GAT GGT GGT TAT GGA GGA GGC GGC CCT
A2 --- --- --- --- --G -A- --A GGA -GA CCT GGA --- --C A-- TTT --- --T A-- --C
p.A1/ A1* G D G Y N G F G N D G G Y G G G G P
p.A2 - - - - - Y - G G P G - - N F - - S -

A1* GGT TAC TCT GGA GGA AGC AGA GGC TAT GGA AGT GGT GGA CAG GGT TAT GGA AAC CAG GGC
A2 --- --T GGA --- --- --A G-- --A --- --T G-- --A --- --CT --A --- --C --- --- --T
p.A1* G Y S G G S R G Y G S G G Q G Y G N Q G
p.A2 - - G - - R G - - - G - - P - - - - -

A1* AGT GGC TAT GGC GGG AGT GGC AGC TAT GAC AGC TAT AAC AAC GGA GGC GGA GGC GGC TTT
A2 G-G --- --C --A --T G-- --- --- -A- --- ---A --- --A AAT -A-
p.A1* S G Y G G S G S Y D S Y N N G G G G G F
p.A2 G - - - - G - - N - - - - N Y

*

A1(α)/A1* GGC GGT GGT AGT GGA AGC AAT TTT GGA GGT GGT GGA AGC TAC AAT GAT TTT GGG AAT TAC
A2 --A --- --- -AT --- --- --- --A --- --T
p.A1 G G G S G S N F G G G G S Y N D F G N Y
p.A2 - - - N - - - - - - -

A1(α) AAC AAT CAG TCT TCA AAT TTT GGA CCC ATG AAG GGA GGA AAT TTT GGA GGC AGA AGC
A2 --- C-G --A C-- --T --C -AC --T --A --- --- A-T --- --C --- --T --T --C --G AAC
p.A1 N N Q S S N F G P M K G G N F G G R S
p.A2 - Q - P - - Y - - - - S - - - - S R N

A1(α) TCT GGC CCC TAT GGC GGT GGA GGC CAA TAC TTT GCA AAA CCA CGA AAC CAA GGT GGC
A2 ATG GGG --A --A --- --T --A --- AA- T-T GGT CCA -G- GGC AGT G-- GGA AGT --G --T
p.A1 S G P Y G G G G Q Y F A K P R N Q G G
p.A2 M G - - - - - N Y G P G G S G G S - -

A1(α) TAT GGC GGT TCC AGC AGC AGC AGT AGC TAT GGC AGT GGC AGA AGA TTT TAA TTAGGAACAA
A2 --- --T --G AGG --- C-A TAC TGA GCTTCTCTCTATTGGCCATGGGCTTCACTGTATAATAGGAGAGGAT
p.A1 Y G G S S S S S S Y G S G R R F stop
p.A2 - - - R - R Y stop

A1(α) AGCTTAGCAGGAGAGAGAGCCAGAGAAGTGACAGGGAAGCTACAGGTTACAACAGATTTGTGAAGCTAGCCAAAGCACA
A2 AGAGCCAGAGGTAACAGAACAGCTTCAGGTTATCGAATAACCAATGTTAAGGAAACTCTTATCTCAGTCATGCATAA

A1(α) GTGGTGGCAGGGCTAGCTGCTACAAAGAAGACATGTTTGTAGACAAATACTCATGTGTATGGGCAAAAACTCGAGGAC
A2 ATATGCAGTGATATGCCAGAAGACACAGAGCAGATGCAGAGAGCCATTTGTGAATGGAATTGATTATTAATAACAT

A1(α) TGTATTTGTGACTAATTGTATAACAGGTTATTTTAGTTTCTGTTCTGTGGAAAGTGTAAGCATTCCAACAAAGGGTTT
A2 TACCTTACTGTGGAGGAAGGATTGTAACAAAAATGCCTTGAGACAGTTTCTAGCTTTTTAATTGTTGTTCTTTCT

A1(α) TAATGTAGATTTTTTTTTTGACCCCATGCTGTTGATTGCTAAATGTAAACAGTCTGATCCTGACGCTGAATAAATGT
A2 AGTGGTCTTTGTGAAGAGTGTAAGACATTCCTCTTTGATAATGTAAATTTGTAAGTTTCAGGTGACATGTGAACCT

A2 TTTTAAAGATTTTTCTCAAAGTTTTGAAAAGCTATTAGCCAGGATCATGGTGAATAAGACATAACGTTTTCTCTTAA

A2 AAAAAATTAAGTCGTGTGTAGAGTTAAGAAGCTGTTGTACAATTATGATTTAATAAAATAATCTAAAGGC

3.7.2 Hydropathie-Analyse der A1-, A2- und C3-Proteine

Nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982) wurden Hydropathieprofile für die abgeleiteten A1-, A2- und C3-Proteinsequenzen erstellt. Die Berechnung der Hydropathiewerte erfolgte über eine Segmentlänge von 5 Aminosäuren.

Die resultierenden Profile der Core-Proteine A1 und A2 zeigen große Ähnlichkeiten (Abb.15). Im N-terminalen Bereich ist der Wechsel hydrophober und hydrophiler Sequenzabschnitte bei beiden Proteinen identisch. Die C-terminalen Bereiche zeichnen sich zwar durch starke Hydrophilie aus, doch ist der qualitative Unterschied der Proteine in diesem Bereich am größten.

Wie zu erwarten, entspricht die Analyse der Hydropathieprofile dem in Abb.14 dargestellten Sequenzvergleich der Proteine A1 und A2.

In Kap.3.7.1 wurde durch Vergleich der Differenzindices darauf hingewiesen, daß das saure Core-Protein C3 nur einen geringen Verwandtschaftsgrad mit den basischen RNP-Proteinen A1 und A2 aufweist. Das Hydropathieprofil in Abb.15 zeigt keine Ähnlichkeiten mit dem Profil des A1- oder A2-Proteins.

Die extrem hohe Hydrophilie des C3-Proteins könnte eine Erklärung für seine abnorme Beweglichkeit im elektrischen Feld sein.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden die Core-Proteine auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Für die Proteine A1, A2 und C3 wurden die folgenden relativen Molekulargewichte (M_r) ermittelt:

Protein	M_r / kd	M_r^U / kd	M_s / kd
A1	31	38	34,1
A2	32,5	38	36
C3	38,5	37	31,8

M_r^U = relatives Molekulargewicht in einem 8 M Harnstoff/Polyacrylamidgel

M_s = berechnetes Molekulargewicht des sequenzierten Proteins

Die Molekulargewichtsberechnung der Proteine, deren Aminosäuresequenz nach Sequenzierung ihrer cDNA abgeleitet wurde, (M_s), zeigt, daß das Core-Protein C3 kleiner ist, als ursprünglich angenommen wurde. Die Molekulargewichte der A1- und A2-Proteine liegen im Bereich der experimentell bestimmten, relativen Molekulargewichte.

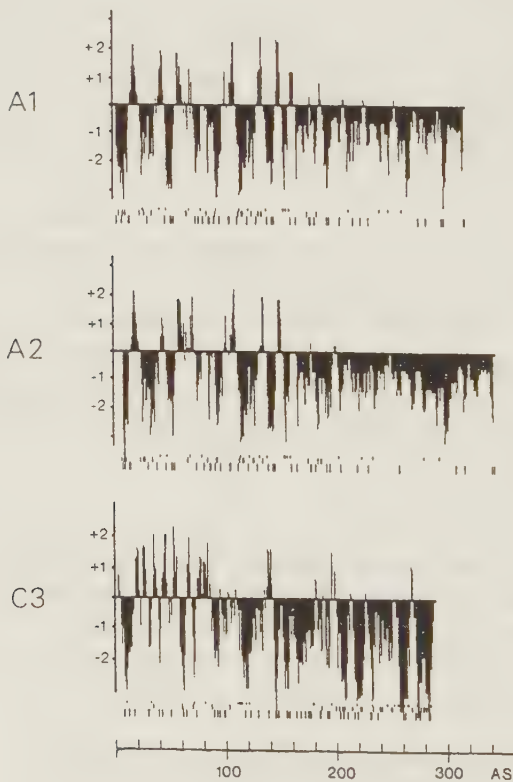


Abb.15 Hydropathieprofile der Core-Proteine A1, A2 und C3

Die Hydropathiewerte wurden nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982) über eine Segmentlänge von 5 Aminosäuren bestimmt und gegen die Gesamtlänge des Proteins (in Aminosäuren) aufgetragen mit Angabe der Aminosäuren D(·), E(:), R+K(↑). Hydrophobe Bereiche haben positive Werte (+), hydrophile Abschnitte zeichnen sich durch negative Werte aus (-).

3.7.3 Analyse der RNA-Bindungsstellen der Coreproteine A1, A2 und C3

Die Kenntnis der A2-Sequenz ermöglichte es, eine Peptidkarte des A2-Proteins nach V8 Protease-Behandlung zu erstellen, und diese mit den "V8-Kartierungen" der Coreproteine A1 und C3 zu vergleichen (siehe Abb.16).

Die Positionen der Peptide, die nach limitierter Verdauung mit V8 Protease entstanden, konnten (über Molekulargewichtsberechnungen) auf dem Protein angegeben werden. Die Nomenklatur der einzelnen Peptide entspricht der Bezeichnung in Abb.3; A.o. Die Aminosäuresequenz-Daten, die für einige Peptide bekannt waren, stimmen mit der vorliegenden Karte überein (Werr, 1984).

Swanson et al. veröffentlichten im Mai 1987 eine konservierte Sequenz (KS), die in RNA-bindenden Proteinen vorkommt. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, kommt diese Sequenz je zweimal in den Proteinen A1 und A2 und einmal im Coreprotein C3 vor.

Konsensussequenz	$\begin{smallmatrix} R & G & F & G & F & V & X & F \\ & K & G & F & A & F & V & Y \end{smallmatrix}$	Konsensussequenz enthaltendes Peptid
A1 (AS 55-57)	RGFGFVTY	A1/I; A1/II ^u
A1 (AS 146-153)	RGFAFVTF	A1/I; A1/III
A2 (AS 50-57)	RGFGFVTF	A2/I; A2/II ^u
A2 (AS 141-148)	RGFGFVTF	A2/I; A2/IV
C3 (AS 50-57)	KGFAFVQY	C3/I; C3/III

Die Peptide, die diese konservierte Sequenz enthalten, zeigten bis auf eine Ausnahme keine starke RNA-Bindungsfähigkeit. Die in Kap. 3.2.2 vorgestellte Versuchsreihe ließ die RNA-Bindungsdomänen der Core-Proteine A1, A2 und C3 in den Peptiden A1/II, A2/II und C3/I; C3/II vermuten.

Das Peptid C3/I zeigte starkes RNA-Bindungsvermögen, da es den Bereich des C3/II einschließt, und nicht, weil es die Konsensussequenz enthält.

Eine analoge Betrachtungsweise führt bei den Core-Proteinen A1 und A2 zu dem Ergebnis, daß es sich bei den RNA-bindenden Proteinfragmenten um die Peptide A1/II^o und A2/II^o handelt.

Enthielten die Peptide A1/II^u bzw. A2/II^u die RNA-Bindungsdomäne, müßte die RNA auch an die Proteinfragmente A1/I und A2/I binden.

Auffällig ist die Tatsache, daß die RNA-bindenden Peptide der Core-Proteine A1 und A2 keine Schnittstelle für die V8 Protease aufweisen; sogar im Falle des C3-Proteins, das sich in seinen Eigenschaften sehr von den basischen Coreproteinen unterscheidet, befindet sich die RNA-Bindungsdomäne in einem Peptid, das auf einer Länge von 83 Aminosäuren keine V8-Schnittstelle enthält.

Die Fähigkeit der Proteine A1, A2 und C3, RNA zu binden, ist durch das Vorkommen überwiegend positiver Aminosäuren innerhalb der V8-Peptide A1/II^o, A2/II^o und C3/II zu erklären.

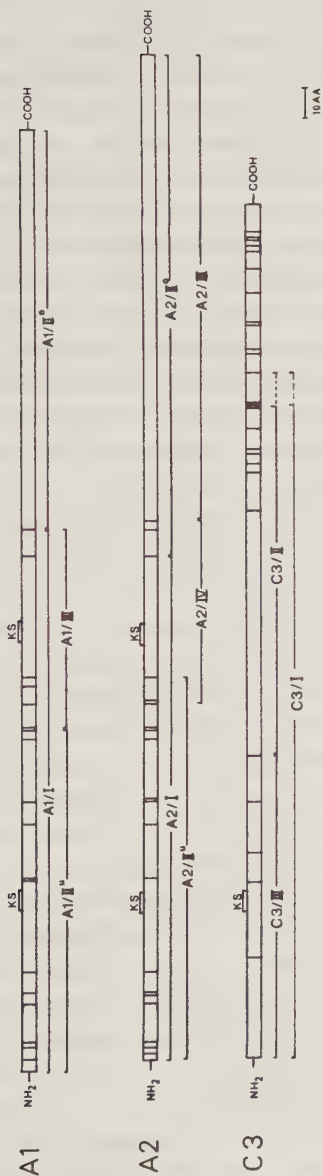


Abb. 16

Peptidkartierung der Core-Proteine A1, A2 und C3 mit V8 Protease

Die Proteinpeptide sind als Balken dargestellt unter Angabe der Schnittstellen der V8 Protease. Die Positionen der Peptide, die nach limitierter Proteolyse entstehen, sind unter dem jeweiligen Protein angegeben. Die Nomenklatur entspricht der Peptidbezeichnung in Abb. 3; A. o.).

KS = Konsensussequenz RNA-bindender Proteine

4. Diskussion

Seit den sechziger Jahren ist bekannt, daß Ribonukleoprotein-Komplexe (hnRNPs) eine der Hauptstrukturen im Zellkern sind (Gall & Callan, 1962; Samarina et al., 1968). Nach der Entdeckung, daß Strukturgene und ihre Transkripte (die in den RNP-Partikeln enthaltenen hnRNAs) in höheren Eukaryoten intervenierende Sequenzen enthalten, die nicht in den kodierten Proteinen vorkommen, wurden Versuche zur Aufklärung des Spleißmechanismus unternommen (Tiemeier et al., 1978; Hernandez & Keller, 1983). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls untersucht, welche Funktionen den RNP-Proteine bei den Prozessierungsreaktionen zukommen. Da RNP-Proteine mit jeder einzelsträngigen Nukleinsäure partikuläre Strukturen ausbilden, wurde angenommen, daß sie zum Schutz und zur Verpackung der hnRNA dienen (Wilk, 1984). Das Interesse an ihrer Charakterisierung nahm deutlich zu, als Choi et al. (1986) die Beteiligung des RNP-Proteins C3 am hnRNA-Spleißen zeigen konnte.

4.1 Charakterisierung der RNP-Proteine

Die Zusammensetzung der hnRNP-Partikel ist wesentlich komplexer, als ursprünglich angenommen wurde. Ihre Aufreinigung mit monoklonalen Antikörpern zeigte, daß sie bis zu 20 verschiedene Proteine pro Partikel enthalten (Piñol-Roma et al., 1988). Die zu den RNP-Partikeln zählenden Core-Proteine (A-, B- und C-Proteine) stellen eine Hauptkomponente dieser Partikel dar.

Die unerwartete Komplexizität der hnRNP-Proteine läßt sich am Beispiel des Core-Proteins A1 verdeutlichen. Riva et al. konnten 1986 zeigen, daß das einzelstrang-DNA-bindende Protein UP I (ssDBP UP I) mit dem Core-Protein A1 immunologisch kreuzreagiert. Bei dem Versuch, eine UP I-spezifische cDNA zu isolieren, wurde die erste cDNA-Sequenz des Core-Proteins A1 gefunden. Die Vermutung, daß das UP I ein proteolytisches Spaltprodukt des A1-Proteins ist, wurde durch die Analyse weiterer A1-homologer cDNAs bestätigt (te Heesen, 1986). Es wurden zwei verschiedene cDNAs sequenziert, die unterschiedliche Längen im 3'-nichttranslatierten Bereich

aufweisen und mit zwei Aminosäureaustauschen für das Protein A1 kodieren (Melchers, 1987). Der Vergleich der Protein- und cDNA-Sequenzdaten des A1 aus Mensch, Rind und Ratte zeigt, daß die Primärstruktur über 80 Millionen Jahre hochkonserviert blieb (Kumar et al., 1986; Riva et al., 1986; Cobianchi et al., 1988).

S.te Heesen charakterisierte eine weitere A1-spezifische cDNA (pA1-Ins.), die eine Insertion von 156 bp im Triplet für die Aminosäure 250 aufweist. pA1-Ins.-Klone wurden aus zwei verschiedenen cDNA-Bibliotheken isoliert. Die Sequenzhomologie der A1-Insert cDNA sowohl zur A1-, als auch zur A2-Sequenz (Kap.3.7.1; Abb. 14) deutet darauf hin, daß diese cDNA für ein weiteres basisches Coreprotein kodiert. Wie die Differenzindices anzeigen (siehe Kap. 3.7.1), könnte ein potentiell "Bindeglied" zwischen den Coreproteinen A1 und A2 das basische Protein B2 sein:

$$DI (A1-B2) = 7,5$$

$$DI (A2-B2) = 3,2$$

$$DI (A1-A2) = 8,6$$

Die nahe Verwandtschaft der A- und B-Proteine wurde von Leser et al. (1984) immunologisch nachgewiesen und zeigt sich außerdem in der Aminosäurezusammensetzung der Proteine. Sie besitzen einen außergewöhnlich hohen Glycinanteil (20-25%) und enthalten die modifizierte Aminosäure Dimethylarginin. In dem niederen Eukaryoten *Artemia Salina* wurde ein RNA-bindendes Protein nachgewiesen (HD 40), das die gleichen Merkmale aufweist (hoher Glycinanteil, modifizierte Aminosäuren; Marvil et al., 1980) und , wie das Einzelstrang-DNA-bindende Protein UP I, helixdestabilisierende Eigenschaften besitzt. Das Protein HD 40 ist die Hauptprotein-Komponente der nukleären RNPs in *Artemia Salina* (Thomas et al., 1981). Dies weist darauf hin, daß die hnRNP-Proteine von einer Multigenfamilie kodiert werden, die sich im Laufe der Evolution aus einem Gen entwickelt hat. Die Proteine dieser Genfamilie weisen neben gemeinsamen Merkmalen Unterschiede in ihrer Struktur auf, die für die individuellen Funktionen jedes einzelnen Proteins im RNP-Partikel verantwortlich sind.

Die RNP-Partikel ruhender Rinderlymphozyten enthalten signifikant geringe Mengen des Core-Proteins A1; ihre Proteine zeigen vielfache Ladungsisomere, die teilweise durch Phosphorylierungen zu erklären sind. Lektin-Stimulierung der Lymphozyten führt zu einer drastischen Zunahme der hnRNA-Synthese und 40S hnRNP-Komplexbildung (Kecske-methy & Schäfer, 1982). Im RNP-Partikel nimmt die Konzentration des Core-Proteins A1 soweit zu, daß das Verhältnis der einzelnen Proteine im RNP-Partikel aus HeLa Zellen und stimulierten Rinderlymphozyten annähernd identisch ist (Henrich et al., 1986). Die Anzahl der Ladungsisomere ist in lektinbehandelten Lymphozyten vermindert. Dies deutet darauf hin, daß eine einfache Aktivitätsänderung der modifizierenden Enzyme regulierend auf die Genexpression wirkt.

Die RNA-Bindungsfähigkeiten gelelektrophoretisch getrennter, membranfixierter RNP-Proteine aus stimulierten Rinderlymphozyten und HeLa S3-Zellen unterscheiden sich minimal voneinander (Henrich, 1985; Kap.3.2). Starke RNA-Bindungen zeigen die basischen Core-Proteine A1 und A2 aus beiden Spezies, B1a aus HeLa S3-Zellen und das Protein C1 aus stimulierten Rinderlymphozyten. Wie die Sequenzdaten des A1-Proteins aus verschiedenen Eukaryoten zeigen, sind die RNP-Proteine hochkonserviert. Das veränderte Bindungsverhalten der basischen Core-Proteine C1 und B1a aus Lymphozyten- bzw. HeLa- Zellen liegt vermutlich in der zellspezifischen, posttranslationalen Modifikation der Proteine begründet.

Der Sequenzvergleich RNA-bindender Proteine führte zur Detektion einer Konsensussequenz, die als potentielle RNA-Bindungsstelle postuliert wurde: NH₂- K/R - G - F - G/A - F - V - X - F/Y -COOH, (Swanson et al., 1987).

Diese Sequenz ist im aminoterminalen Bereich des RNP-Proteins C3 einmal und je zweimal in den basischen RNP-Proteinen A1 und A2 vorhanden. Durch die Variabilität der postulierten RNA-Bindungsstelle wären die unterschiedlichen RNA-Affinitäten der einzelnen Proteine erklärbar.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die RNP-Konsensussequenz zwar die Familie der RNA-bindenden Proteine charakterisiert, jedoch nicht für eine spezifische RNA-Bindung ausreicht.

Das einzelstrang-DNA-bindende Protein UP I enthält als proteolytisches Spaltprodukt des RNP-Proteins A1 den aminoterminalen Bereich des Core-Proteins und somit beide RNP-Konsensussequenzen.

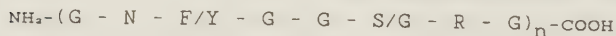
Bindungstests mit beiden Proteinen haben gezeigt, daß das Protein A1 eine höhere Bindungskapazität für einzelsträngige Nukleinsäuren besitzt als das UP I-Protein, und daß diese Bindung im Gegensatz zum UP I kooperativ verläuft (Cobianchi et al., 1988). Dieses unterschiedliche Verhalten beider Proteine ist durch die Beteiligung der carboxyterminalen Domäne des A1-Proteins an der Nukleinsäurebindung zu erklären.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente weisen darauf hin, daß die signifikant starke RNA-Bindung allein durch den carboxyterminalen Bereich des A1-Proteins zustandekommt (V8-Peptid A1/II°). Unter der Annahme, daß isolierte Proteinpeptide dieselbe Sekundär- und Tertiärstruktur wie im intakten Protein aufweisen, ermöglichten RNA-Bindungsstudien an die membranfixierten V8-Peptide der RNP-Proteine A1, A2 und C3 die Lokalisierung der jeweiligen RNA-Bindungsdomänen (siehe Kap.3.7.3).

Der Vergleich der basischen RNP-Proteine A1 und A2 anhand ihrer Sequenzen und Hydropathieprofile zeigte eine starke Homologie der aminoterminalen Bereiche beider Proteine, die unter anderem die RNP-Konsensussequenzen enthalten. Die c-terminalen V8-Peptide A1/II° und A2/II°, die für die RNA-Bindung verantwortlich sind, unterscheiden sich stärker voneinander. Obwohl die RNA-Bindungsexperimente an die gelelektrophoretisch getrennten, membranfixierten RNP-Proteine auf eine vergleichbare RNA-Affinität der Proteine A1 und A2 hinwiesen (siehe Kap.3.2.1), ist die RNA-Bindungskapazität des A1/II°-Peptids signifikant höher als die des c-terminalen A2-Peptids (vergleiche Kap.3.7.2). Quervernetzungsversuche bestätigen, daß das Protein A1 *in vivo* fest an hnRNA gebunden ist, und daß das Protein A2 hingegen eine schwächere RNA-Bindung eingeht (Choi & Dreyfuss, 1984).

Die carboxyterminalen Bereiche beider Proteine (A1 und A2) zeichnen sich durch das Vorkommen aromatischer Reste aus (Tyrosin und Phenylalanin), die durch α -Helix-freie Bereiche hoher Flexibilität getrennt sind. Die α -Helix-unterbrechende Aminosäure Glycin ist hier dominant vertreten.

Im C-terminalen Bereich des A1-Proteins konnte eine Sequenz von acht Aminosäuren identifiziert werden, die sich mit minimalen Aminosäureaustauschen mehrfach wiederholt (Cobianchi et al., 1988):



Die durch die Aminosäuren Glycin bedingte gestreckte Struktur der A1 RNA-Bindungsdomäne ermöglicht die hydrophobe Wechselwirkung der aromatischen Reste Phenylalanin und Tyrosin mit den Basen der RNA (hydrophobes 'stacking' von Protein und RNA).

Der carboxyterminale Bereich des A2-Proteins enthält ein sich viermal wiederholendes Sequenzmotiv aus je sieben Aminosäuren:



Die verminderte Fähigkeit des A2-Proteins, RNA zu binden, kann durch das geringere Vorkommen helixunterbrechender Aminosäuren erklärt werden; dies führt möglicherweise dazu, daß die Wechselwirkung zwischen den Basen der RNA und den aromatischen Aminosäuren, die im A2-Protein in kürzeren Abständen vorkommen als im Protein A1, herabgesetzt ist.

Das saure RNP-Protein C3 bindet bevorzugt an uridinreiche RNA-Sequenzen (Swanson & Dreyfuss, 1988). Diese Sequenzspezifität läßt eine andere Art der RNA-Bindung vermuten, als sie für die RNP-Proteine A1 und A2 postuliert wurde. Das RNA-bindende V8-Peptid C3/II enthält eine prolinreiche Domäne, die N-terminal von aromatischen Aminosäuren und C-terminal von geladenen Aminosäuren umgeben ist (Swanson et al., 1987). Die Dominanz der positiv geladenen Aminosäuren in dieser c-terminalen, α -helicalen Domäne läßt eine 'ionische' Bindung mit dem Phosphatrückgrat der RNA

vermuten, die die hydrophobe Wechselwirkung der aromatischen Aminosäuren mit den Basen der RNA überdeckt.

Wie RNase-Behandlungen gezeigt haben, sind RNA/Protein-Interaktionen für den Zusammenhalt der RNP-Monopartikel essentiell (Dreyfuss, 1986). In vitro Bindungstests haben andererseits gezeigt, daß einige RNP-Proteine keine Affinität zur RNA besitzen (Kap.3.2.1; Henrich, 1985). Ihre Beteiligung an der RNP-Partikelbildung ist auf Protein/Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Die funktionelle Betrachtung der einzelnen Proteine im RNP-Partikel erfordert die Analyse und Verknüpfung der RNA/Protein- und Protein/Protein-Interaktionen.

4.3 Einfluß von Protein/Protein-Interaktionen auf die RNA-Bindungsfähigkeit des Proteins A1

Wie in Kap.4.2 erwähnt, konnten Cobianchi et al. (1988) zeigen, daß die Bindung des A1-Proteins an einzelsträngige Nukleinsäuren kooperativ verläuft. Der beschriebene Reaktionsansatz enthielt 0,2mM EDTA. In Anlehnung an in vitro Spleiß- und Selbstspleißexperimente wurde die Protein A1/RNA-Bindung in Gegenwart von 5 mM Magnesiumchlorid wiederholt. Unter diesen Bedingungen neigen die RNP-Proteine zur Aggregation (Sapp et al., 1986), und das Protein A1 bindet nichtkooperativ an RNA (siehe Kap.3.2; Abb.4). Wird die RNA mit den Proteinen A1 und A2 komplexiert, erniedrigt sich die Proteinkonzentration, die zur vollständigen Abdeckung der RNA notwendig ist. Die Interaktion der A1 und A2 Proteine führt zu einer veränderten RNA-Bindung. Der resultierende Komplex zeigt eine größere Beweglichkeit im elektrischen Feld als der A1/RNA-Komplex; dies deutet auf eine kompaktere Partikelbildung hin.

Die RNA/Protein-Komplexbildung mit den RNA-bindenden RNP-Proteinen A1 und C3 unterstützt die These, daß das Protein C3 die A1-Bindung an einzelsträngige Nukleinsäuren fördert. Experimente zur Rekonstitution von RNP-Partikeln hatten gezeigt, daß das Protein A1 erst in Gegenwart der sauren Core-Proteine an der Bildung eines 30-40 S RNP-Partikels teilnimmt (Henrich, 1985).

Die geringste Proteinkonzentration zur Komplexierung von RNA wird bei Einsatz aller RNP-Proteine beobachtet.

Diese in vitro Daten deuten darauf hin, daß eine variable RNP-Partikelbildung in vivo denkbar ist, um unterschiedliche Funktionen in der Zelle erfüllen zu können.

4.4 Funktion der hnRNP-Proteine

In situ Untersuchungen an nascierender hnRNA zeigten, daß die RNP-Verteilung auf der RNA nicht zufällig ist, sondern einer gewissen Ordnung unterliegt (Beyer et al., 1980/1981). In vitro Rekonstitutionen von RNP-Komplexen gaben die ersten Hinweise darauf, daß die Partikelbildung mit eukaryotischer RNA begünstigt ist (Henrich, 1985). Die kürzlich beschriebene Spezifität des RNP-Proteins C3 für uridinreiche Sequenzen (Swanson & Dreyfuss, 1988) führte schließlich zu der These, daß hnRNP-Proteine bevorzugt an die intervenierenden Sequenzen der hnRNAs binden. Die regulatorische Funktion der RNP-Proteine wird durch die Beteiligung des C3-Proteins an der Reaktion des hnRNA-Spleißens deutlich (Choi et al., 1986). Durch die Analyse der RNP-Partikel aus ruhenden Rinderlymphozyten konnte nachgewiesen werden, daß das A1-Protein in vivo nicht essentiell für die RNP-Komplexbildung ist (Henrich et al., 1986) und in Abhängigkeit von der Zellaktivität Bestandteil des hnRNP-Partikels ist. In vitro Untersuchungen lassen erkennen, daß das A1-Protein helixdestabilisierende Eigenschaften besitzt und in der Lage ist, RNA vor Nukleasen zu schützen (Kap.3.3 und 3.4.2). Es ist denkbar, daß ebenfalls in vivo die Zunahme der A1-Konzentration dazu führt, daß die synthetisierte hnRNA vor nukleolytischem Abbau geschützt wird.

In vitro Spleißexperimente haben gezeigt, daß die in RNP-Präparationen enthaltenen Faktoren (Proteine und snRNPs) als Proteinkomponente nicht ausreichend sind, um RNA spleißen zu können; vielmehr enthalten die 40 S sedimentierenden RNP-Partikel eine Nuklease, die in diesen Versuchen zum nukleolytischen Abbau der RNA geführt hat (siehe Abb.6).

Diese Hinweise, daß die RNP-Partikel Proteine enthalten, die einerseits den Schutz und andererseits den Abbau der hnRNA bewirken können, erhärten die Vermutung, daß die RNP-Proteine durch variable Komplexbildung mit der hnRNA an der Regulation der Genexpression auf der Ebene der Prozessierung teilnehmen.

4.5 Gene der hnRNP-Proteine

Die funktionelle Betrachtung der RNP-Proteine erfordert die Strukturanalyse ihrer Gene. Enthielten die hnRNP-Gene intervenierende Sequenzen, müßten ihre Transkripte während der Prozessierung gespleißt werden. Sie kodieren jedoch für einen Teil der Proteine, die zum Spleißen essentiell sind (siehe Protein C3). Intronlose Gene, die für die hnRNP-Proteine kodieren, ließen diese Problematik nicht entstehen. Sie würden exprimiert, und ihre Produkte, die RNP-Proteine, könnten an den Prozessierungsreaktionen anderer hnRNAs partizipieren.

Die Southern-Analysen restringierter genomischer DNA mit A1- und C3-spezifischen Hybridisierungsproben zeigten in beiden Fällen ein komplexes Hybridisierungsmuster von ca. 20 Signalen im Bereich von 1-20 kb. Für das Core-Protein A1 konnte ein intronloses Gen nachgewiesen und charakterisiert werden (Melchers, 1987). Die Sequenzanalyse zeigte, daß es die Merkmale prozessierter Pseudogene besitzt. Möglicherweise entstand dieses Retrotransposon durch reverse Transkription einer der beiden A1 mRNAs, dessen resultierende cDNA in das Genom reintegriert wurde. Der Beweis, daß dieses Gen exprimiert wird, steht noch aus. Die Existenz zweier verschiedener A1-mRNAs und die Komplexizität der genomischen Southern-Analyse weisen auf mindestens ein weiteres A1-Gen hin; es ist anzunehmen, daß ebenfalls intronhaltige A1-Gene existieren.

Aus einer menschlichen genomischen Bibliothek isolierte H. Werr 60 genomische C3-positive Klone (Werr, 1988). Einer dieser Klone wurde sequenziert und in Analogie zum A1 als C3 Retrotransposon identifiziert. Im Gegensatz zum intronlosen A1-Gen enthält das C3

Retrotransposon im kodierenden Bereich sowohl Stopkodons, als auch Deletionen und Insertionen in Bezug auf die sequenzierte C3 cDNA (Swanson et al., 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine A2-spezifische genomische Southern-Analyse durchgeführt, die die Vermutung bestätigen sollte, daß intronlose Gene charakteristisch für die Familie der RNP-Proteine sind. Die Restriktion der genomischen DNA wurde mit den gleichen Endonukleasen durchgeführt, die zur Isolierung der A2-homologen cDNA-Hybridisierungsprobe benutzt wurden (siehe Kap.3.6). Das Hybridisierungssignal, daß der Länge der zur Hybridisierung eingesetzten A2-cDNA entsprach, deutet auf ein intronloses Gen hin, daß für das Protein A2 kodiert. Die darüberhinaus detektierten genomischen DNA-Fragmente deuten aber auch auf die Existenz intronhaltiger A2-Gene hin.

Zur Diskussion der Funktion und des Ursprungs der intronlosen RNP- Gene bedarf es weiterer Untersuchungen, u.a. muß gezeigt werden, ob diese Gene exprimiert werden.

Die Analyse der RNP-Gene in niederen Eukaryoten (z.B. HD 40 aus *Artemia Salina*) wird zu der Entscheidungsfindung beitragen, ob diese intronlosen Gene Retrotransposonen oder evolutionär ursprünglichen Genstrukturen entsprechen.

4.6 Zusammenfassung

Es zeichnet sich ab, daß die RNP-Proteine auf verschiedenen Ebenen die Regulation der Genexpression bewirken. Die Tatsache, daß die Gene der RNP-Proteine A1, A2 und C3 sowohl intronlos, als auch intronhaltig im Genom höherer Eukaryoten vorkommen, kann auf zwei Arten interpretiert werden: entweder spiegeln die intronlosen Gene den evolutionären Ursprung der exprimierten, Intron enthaltenen RNP-Gene wieder - dann müssen sie nicht notwendiger Weise auch exprimiert werden - , oder sie dienen zur schnellen Expression der RNP-Proteine, die teilweise zur Prozessierung anderer intronhaltiger Transkripte benötigt werden.

Es konnte am Beispiel des A1-Proteins gezeigt werden, daß durch proteolytische Spaltung des RNP-Proteins ein helixdestabilisierendes Protein entsteht (UP I), das vermutlich an der DNA-Replikation beteiligt ist (Valentini et al., 1985).

Eine weitere Regulation der RNP-Genexpression ist auf der Ebene der Transkription denkbar. Es konnten jeweils für das RNP-Protein A1 und C3 zwei mRNAs nachgewiesen werden, die sich durch Benutzung zweier verschiedener Polyadenylierungssignale in der Länge ihrer 3'-nichttranslatierten Bereiche unterscheiden. Northern-Analysen zeigten, daß die Konzentration des A1-Proteins auf der Ebene der mRNA reguliert wird (Melchers, 1987).

Im Gegensatz zu den Core-Proteinen A1 und C3 existiert in HeLa-S3 Zellen nur eine A2-spezifische mRNA. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierte und sequenzierte A2-cDNA ermöglichte die detaillierte Analyse der basischen RNP-Proteine A1 und A2. Die durchgeführten RNA-Bindungsexperimente trugen zur Identifizierung der RNA-Bindungsdomäne bei. Die unterschiedliche Fähigkeit der RNP-Proteine A1, A2 und C3, RNA zu binden, konnte durch die Strukturen der RNA-Bindungsstellen erklärt werden. Die C3/RNA-Bindung ist polaren - ionischen Ursprungs, die RNA-Bindung der Proteine A1 und A2 kommt durch hydrophobes 'stacking' der aromatischen Aminosäuren mit den Basen der RNA zustande. Obwohl die basischen Proteine A1 und A2 sehr homolog sind, führen die im c-terminalen Bereich auftretende Sequenzunterschiede zu den unterschiedlichen RNA-Bindungskapazitäten. Es konnte gezeigt werden, daß Protein/Protein-Wechselwirkungen die Bindung des A1-Proteins an RNA beeinflussen. Weitere Untersuchungen (speziell des Spleißmechanismus) werden zeigen, ob die RNP-Proteine durch variable Komplexbildung die Genexpression auf der Ebene der Prozessierung beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis

- Aebi M., H. Hornig, R.A. Padgett, J. Reiser, C. Weissman (1986), Cell 47, 555-565
- Aviv H. & P. Leder (1975),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412
- Babich A., J.R. Nevins & J.E. Darnell (1980),
Nature 287, 246-248
- Benton W.D. & R.W. Davis (1977),
Science 196, 180-182
- Berget S.M. & B.L. Robberson (1986), Cell 46, 691-696
- Beyer A.L., M.E. Christensen, B.W. Walker und W.M. LeStourgeon (1977), Cell 11, 127-138
- Beyer A.L., O.L. Miller und S.L. Mc Knight (1980),
Cell 20, 75-84
- Beyer A.L., A.H. Bouton und O.L. Miller (1981),
Cell 26, 155-165
- Beyer A.L. & Y.N. Osheim (1988),
"Splicing In Vivo", in Bearbeitung
- Bina M., J.R. Feldmann und R.G. Deely (1980),
Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 1278-1282
- Birnboim S.L. & J. Doly (1979),
Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
- Black D.L. & J.A. Steitz (1986), Cell 46, 697
- Blin N., D.W. Stafford (1976),
Nucl. Acids Res. 3, 2303
- Bowen B., J. Steinberg, U.K. Laemmli, H. Weintraub (1980),
Nucl. Acids Res. 8, 1-20

Bradford M. (1976),
 Anal. Biochem. 72, 248-254

Butler E.T. & M.J. Chamberlin (1982),
 J. Biol. Chem. 257, 5772-5778

Buvoli M., G. Biamonti, P. Tsoulfas, M.T. Bassi, A. Ghetti,
 S. Riva und C. Morandi (1988), Nucl. Acids Res. 16, 3751-3770

Cech R.T. & B.L. Bass (1986),
 A. Rev. Biochem. 55, 599

Chabot B., D.L. Black, D.M. LeMaster & J.A. Steitz (1985),
 Science 230, 1344

Choi et al. (1986), Science 231, 1534

Choi Y.D. & G. Dreyfuss (1984),
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7471-7475

Cobianchi F., R.L. Karpel, K.R. Williams, V. Notario & S.H. Wilson
 (1988), J. Biol. Chem. 263; 1063-1071

Cleveland D.W., S.G. Fischer, M.W. Kirschner, U.K. Laemmli
 (1977), J. Biol. Chem. 252, 1102-1106

Dignam J.D., R.M. Lebovitz, R.G. Roeder (1983),
 Nucl. Acids Res. 11, 1475

Dreyfuss G. (1986),
 Ann. Rev. Cell Biol. 2, 459-498

Feinberg A.P. & B. Vogelstein (1983),
 Analyt. Biochem. 123, 6-13

Foe V.E., L.E. Wilkinson und C.D. Laird (1976),
 Cell 9, 131-146

Frendewey D., A. Krämer & W. Keller (1987),
 in: "Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology",
 Vol. LII, 287-298

- Gall J.G. (1955),
Brookhaven Symp. Biol. 8, 17-32
- Gall J.G. (1956),
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 393-396
- Gall J.G. & H.G. Callan (1962),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 562-570
- Grabowski et al. (1985), Cell 42, 345
- Green M.R., T. Maniatis & D.A. Melton (1983),
Cell 32, 681-694
- Green M.R. (1986),
Ann. Rev. Genet. 20, 671-708
- Henrich B. (1985),
Diplomarbeit: "Untersuchungen für die in vitro Bildung von hnRNP-Komplexen und die Funktion der Coreproteine A1, A2 und C3 in hnRNP-Partikeln aus Säugerzellen"
- Henrich B., H. Werr, H.-E. Wilk & K.P. Schäfer (1986),
in "Leukocyte Biology 5, Leukocytes and Host Defence", 143-151
Eds.: J.J. Oppenheim & D.M. Jacobs; Alan R. Liss, N.Y.
- Karn J., G. Vidali, L.C. Boffa und V.G. Allfrey (1977),
J. Biol. Chem. 252, 7307-7322
- Konarska M.M., R.A. Padgett, P.A. Sharp (1984),
Cell 38, 731
- Konarska M.M. & P.A. Sharp (1987),
Cell 49, 763-774
- Konarska M.M. et al. (1985),
Nature (London) 313, 552
- Kozak M. (1987),
Nucl. Acids Res. 15, 8135-8142
- Krainer A.R., T. Maniatis, B. Ruskin & M.R. Green (1984),
Cell 36, 993

- Kyte J. & Doolittle R.F. (1982),
J. Mol. Biol. 157, 105-132
- Laemmli U.K. (1970). Nature 227, 680-685
- Lang K.M. & R.A. Spritz (1987),
Mol. Cell Biol. 7, 3428-3437
- Leder P., D. Tiemeier, L. Enquist (1977),
Science 196, 175
- Lerner M.R. et al. (1980), Nature 283, 220
- Maniatis T., E.F. Fritsch & J. Sambrook (1982),
Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Labor.
- Maniatis T. & R. Reed (1987),
Nature 325, 673-678
- Mariano A., G. Blanco, M. Konarska & P.A. Sharp (1988),
"Two proteins in HeLa cell nuclear extract interact specifically
with pre-mRNAs"; Cold Spring Harbor-Meeting
- Mariman E.C.M., R.J. van Beek-Reinders & W.J. van Venrooij
(1983), J. Mol. Biol. 163, 239-256
- Marvil D.K., L. Nowak und W. Szer (1980),
J. Biol. Chem. 255, 6466-6472
- Melchers K. (1987),
Dissertation: "RNA-Metabolismus in lektinaktivierten
Rinderlymphozyten"
- Melton et al. (1984), Nucl. Acids Res. 12, 7035
- Mount S.M. & J.A. Steitz (1981),
Nucl. Acids Res. 9, 6351
- Müller W.E.G., A. Bernd & H.C. Schröder (1983),
Mol. Cell. Biochem. 53-54, 197-200
- Nevins J.R. (1983), Ann. Rev. Biochem. 52, 441-446

- Nudel U., H. Soreq, U.Z. Littauer, G. Marxbaix, G. Hcx,
M. Leelereq, E. Hubert & H. Chantrenne (1976),
Eur. J. Biochem. 64, 115-121
- O'Farrell P.Z., H.M. Goodman, P.H. O'Farrell (1977),
Cell 12, 1133-1142
- Osheim Y.N., O.L. Miller und A.L. Beyer (1985),
Cell 43, 143-151
- Padgett R.A., S.F. Hardy & P.A. Sharp (1983),
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 5230
- Padgett R.A., P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S.Seiler & P.A.
Sharp (1986), Ann. Rev. Biochem. 55, 1119-1150
- Pandolfo M., O. Valentini, G. Biamonti, C. Morandi, S. Riva
(1985), Nucl. Acids Res. 13, 6577-6590
- Pederson T. (1974), J. Mol. Biol. 83, 163-183
- Peters J.H. (1975),
in "Methods in Cell Biology" 9, 1-11
Ed. D.M. Prescott, Academic Press, London
- Peters K.E. & D.E. Comings (1980),
J. Cell Biol. 86, 135-155
- Puck T.T., P.J. Marcus & S.J.Cuciura (1956),
J. Exp. Med. 102, 273-284
- Queen C. & L. Korn (1984),
Nucl. Acids Res. 12, 581-599
- Rhoads R.E. (1985),
Prog. Mol. Subcell. Biol. IX
- Richardson C.C. (1965),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 158-165
- Riva S., C. Morandi, P. Toulfas, M. Pandolfo, G. Biamonti,
B. Merrill, K.R. Williams, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. Werr,
B. Henrich, K.P. Schäfer (1986), Embo J. 5, 2267-2273

Roberts R.J. (1982),
Nucl. Acids Res. 10, 117-144

Ruskin B. & M.R. Green (1985), Cell 43, 131

Samarina O.P., E.M. Lukanidin, J. Molmar, G.P. Georgiev (1968),
J. Mol. Biol. 33, 251-263

Sanger F., S. Miklen & A.R. Coulson (1977),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767-4771

Sapp M., R. Knippers, A. Richter (1986),
Nucl. Acids Res. 14, 6803-6821

Sawa H., M. Ohno, H. Sakamoto & Y. Shimura (1988),
Nucl. Acids Res. 16, 3151-3164

Sharp et al. (1973), Biochemistry 12, 3055-3063

Shatkins A.J. (1976), Cell 9, 645-653

Snyder J. (1964), J. Chromatog. 13, 415

Suggs S.V., T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawaashima, M.J. Johnson, K. Itakura & R.B. Wallace (1981),
in 'Developmental Biology Using Purified Genes.'
D. Brown ed.; Academic Press N.Y., 683

Suria D. & C.C. Liew (1979),
Can. J. Biochem. 57, 32-42

Swanson M.S., T.Y. Nakagawa, K. LeVan & G. Dreyfuss (1987),
Mol. Cell. Biol. 7, 1731-1739

Swanson M.S. & G. Dreyfuss (1988),
Vortrag des Cold Spring Harbor-Meetings,
Titel: "Specific binding and ATP dependent complex formation of
hnRNP proteins at the 3' end of introns"

Thomas J.O. et al., (1981),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2888-2892

- Towbin H., T. Staehelin & J. Gordon (1979),
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354
- Tsanev R.G. & L.P. Djondjurov (1982),
J. Cell Biol. 94, 662-666
- Valentini O., G. Biamonti, M. Pandolfo, C. Morandi, S. Riva
(1985), Nucl. Acids Res. 13, 337-346
- Werr H. (1988), Dissertation:
"hnRNP-Proteine der A- und C-Klasse; vom Protein zur DNA"
- Wilk H.E., Angeli G. und K.P. Schäfer (1983),
Biochemistry 22, 4592-4600
- Wilk H.E. (1984), Dissertation:
"Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Ribonucleoprotein-
komplexen in Säugerzellen"
- Wilk H.E., H. Werr, D. Friedrich, H.H. Kiltz, K.P. Schäfer
(1985), Eur. J. Biochem. 146, 71-81
- Yamamoto K.R. et al. (1970),
Virology 40, 734
- Zaug A.J., P.J. Grabowski und T.R. Cech (1983),
Nature 301, 578-583
- Zeevi M., J.R. Nevins und J.E. Darnell (1981),
Cell 26, 39-46

Lebenslauf

Persönliche Angaben :

Name : Henrich, Birgit
Geburtstag : 01.06.1960
Geburtsort : Mülheim/Ruhr

Eltern : Ernst Georg Henrich , kaufm. Angestellter
 Maria Magdalena Henrich, geb. Reiners, Lehrerin

Ausbildung :

05.12.1966 Tag der ersten Einschulung

Herbst '70 Übergang zum Gymnasium
 (Städt. Gymnasium an den Buchen)

25.05.1979 Abgang vom Gymnasium mit dem Abschluß der
 allgemeinen Hochschulreife

22.08.1979 Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum
 für den Studiengang Chemie (Diplom)

09.10.1981 Diplom-Vorprüfung im Fach Chemie

29.07.1985 Diplom-Hauptprüfung im Fach Chemie mit Schwer-
 punkt Biochemie

seit 01.09.1985 Promotion am Lehrstuhl für Biochemie an der
 Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Dr. K.P.
 Schäfer

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606